

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Tomáš Ovad

Příprava a základní charakterizace eukaryotického iniciačního faktoru

2 α a jeho hemem regulované kinasy

Preparation and preliminary characterization of the eukaryotic initiation
factor 2 α and its heme regulated kinase

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitelka: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 18. 6. 2021

Poděkování

Rád bych na tomto místě co nejsrdečněji poděkoval svojí školitelce, doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D., za nekonečnou ochotu a profesionální vedení po celou dobu řešení této bakalářské práce. Velké poděkování patří také Mgr. Jakubu Vávrovi za poskytnutí konzultací a pomoci při zpracování experimentální části této práce. V neposlední řadě děkuji svým výjimečným rodičům a blízkým přátelům za podporu po celou dobu svého studia.

ABSTRAKT

Hemové sensorové proteiny se podílejí na řadě významných funkcí v prokaryotických i eukaryotických organismech. Příkladem eukaryotického hemového sensorového proteinu je hemem regulovaný inhibitor (HRI), který katalyzuje fosforylaci α -podjednotky eukaryotického iniciačního faktoru 2 (eIF2 α). V rámci této bakalářské práce byl nejprve amplifikován plasmid pET-21c(+)/eIF2 α a jeho vhodnost pro expresi proteinu eIF2 α byla ověřena pomocí dvou nezávislých metod. Následně byly připraveny proteiny HRI a eIF2 α rekombinantní expresí v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) transformovaných plasmidem pET-21c(+)/eIF2 α , resp. HRI. Oba proteiny byly z buněčných preparátů izolovány a purifikovány pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie. Protein eIF2 α byl získán v dostatečně vysokém výtěžku (560 μ g z 1 l TB média) i čistotě (90 %). Nižšího výtěžku (25 μ g z 1 l TB média) i čistoty (20 %) bylo dosaženo v případě proteinu HRI, autenticita získaného preparátu byla nicméně potvrzena spektrofotometrickou charakterizací a ověřením jeho enzymové aktivity. V rámci pilotních experimentů bylo dále zjištěno, že GTP může nahradit ATP při fosforylaci eIF2 α , zatímco UTP a CTP nikoli.

Klíčová slova: hem, sensorové proteiny, eukaryotický iniciační faktor 2 α , kinasa eukaryotického iniciačního faktoru 2 α

ABSTRACT

Heme sensor proteins perform a variety of important functions in both prokaryotic and eukaryotic organisms. Heme-regulated inhibitor (HRI) is an example of a eukaryotic heme-sensor protein, which catalyzes the phosphorylation of the α subunit of the eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α). In this bachelor thesis, the pET-21c(+)/eIF2 α plasmid was amplified and its authenticity for the eIF2 α expression was verified with the use of two independent methods. Next, HRI and eIF2 α were produced using the recombinant expression in *E. coli* BL-21(DE3) cells transformed with the pET-21c(+)/eIF2 α and pET-21c(+)/HRI plasmid, respectively. Both proteins were then isolated from the cells and purified with the use of affinity chromatography and gel permeation chromatography. eIF2 α was obtained in sufficient yield (560 μ g out of 1 l of TB medium) and purity (90%). A lower yield (25 μ g out of 1 l of TB medium) and purity (20%) was reached in the case of HRI. On the other hand, the authenticity of the HRI product was confirmed using spectrophotometric characterization and its enzyme activity was verified as well. Pilot experiments showed that GTP may replace ATP in the process of eIF2 α phosphorylation, while UTP and CTP may not.

Keywords: heme, sensor proteins, eukaryotic initiation factor 2 α , eukaryotic initiation factor 2 α kinase [IN CZECH]

OBSAH

Seznam zkratk a symbolů.....	8
Úvod.....	10
1 Úvodní pojednání o železe.....	11
1.1 Železo v počátcích Země a pozemského života.....	11
1.2 Chemické vlastnosti železa.....	11
1.3 Volné železo a jeho toxicita.....	12
1.4 Hospodaření se železem.....	15
1.4.1 Formy železa v potravě.....	15
1.4.2 Absorpce a distribuce jednotlivých forem železa.....	15
1.5 Regulace hospodaření se železem.....	17
1.5.1 Systémová regulace.....	17
1.5.2 Buněčná regulace.....	18
2 Vázané formy železa.....	20
2.1 Nehemové proteiny.....	20
2.1.1 Fe-S proteiny.....	20
2.1.2 Ferritin.....	20
2.1.3 Transferriny.....	20
2.2 Hem.....	21
2.2.1 Struktura a názvosloví porfyrinů.....	21
2.2.2 Biosyntéza hemu.....	24
2.2.3 Katabolismus hemu.....	25
2.3 Hemoproteiny.....	25
2.3.1 Hemoproteiny zajišťující přenos a uskladnění kyslíku.....	26
2.3.2 Hemoproteiny s enzymovou (oxidoreduktasovou) aktivitou.....	27
2.3.3 Hemoproteiny zajišťující přenos elektronu.....	28
2.3.4 Hemové senzorové proteiny.....	29
3 Hemem regulovaný inhibitor.....	30
3.1 Charakterizace hemem regulovaného inhibitoru.....	30
3.2 Funkce hemem regulovaného inhibitoru.....	32
3.3 Eukaryotický iniciační faktor 2 a jeho fosforylace.....	33
4 Cíle bakalářské práce.....	36
5 Materiál a metody.....	37
5.1 Použité chemikálie.....	37
5.2 Použité přístroje.....	40
5.3 Použité metody.....	41
5.3.1 Příprava agarových ploten.....	41

5.3.2	Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3), resp. <i>E. coli</i> DH5 α , a příprava jejich jednobuněčných kolonií	41
5.3.3	Exprese proteinu eIF2 α , resp. HRI.....	42
5.3.4	Izolace plasmidové DNA nesoucí gen pro eIF2 α	43
5.3.5	Restrikční štěpení plasmidové DNA nesoucí gen pro eIF2 α	44
5.3.6	Horizontální elektroforéza na agarosovém gelu.....	44
5.3.7	Sekvenace plasmidové DNA nesoucí gen pro eIF2 α	45
5.3.8	Izolace proteinu eIF2 α , resp. HRI	45
5.3.9	Studium vlivu donoru fosfátu na fosforylaci proteinu eIF2 α v přítomnosti nebo absenci proteinu HRI	47
5.3.10	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného .	47
5.3.11	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu obsahujícím Phos-tag v přítomnosti dodecylsírany sodného.....	50
5.3.12	Spektrofotometrická analýza plasmidové DNA a proteinu eIF2 α , resp. HRI.....	50
6	Výsledky	52
6.1	Amplifikace plasmidové DNA nesoucí gen pro eIF2 α	52
6.2	Exprese proteinu eIF2 α	53
6.3	Izolace proteinu eIF2 α	54
6.4	Exprese proteinu HRI.....	57
6.5	Izolace proteinu HRI.....	58
6.6	Spektrofotometrická charakterizace proteinu HRI.....	61
6.7	Studium vlivu donorů fosfátu na fosforylaci proteinu eIF2 α v přítomnosti a absenci proteinu HRI.....	62
7	Diskuse.....	63
7.1	Amplifikace plasmidové DNA a kontrola její autenticity.....	63
7.2	Exprese proteinu eIF2 α , resp. HRI.....	64
7.3	Izolace proteinu eIF2 α , resp. HRI.....	66
7.4	Spektrofotometrická charakterizace proteinu HRI.....	69
7.5	Vliv donorů fosfátu na fosforylaci eIF2 α v přítomnosti a absenci proteinu HRI.....	70
8	Závěr	72
	Seznam použité literatury.....	73

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ALA	aminolevulová kyselina (z angl. <i>aminolevulic acid</i>)
ALAS	aminolevulinátsynthasa
ATP	adenosintrifosfát
BMP	kostní morfogenetické proteiny (z angl. <i>bone morphogenetic proteins</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CP	cystein–prolinový
CTP	cytidintrifosfát
CYP	cytochromy P450
DMT	přenašeč dvojmocných kationtů (z angl. <i>divalent metal transporter</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eIF2	eukaryotický iniciační faktor 2
eIF2 α	α -podjednotka eIF2
eIF2 β	β -podjednotka eIF2
ER	endoplasmatické retikulum
GCN2	nederepresibilní hlavní kontrolní kinasa (z angl. <i>general control kinase</i>)
GDP	guanosindifosfát
GSH	redukováný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GTP	guanosintrifosfát
Hb	hemoglobin
HCP	hemový transportní protein (z angl. <i>haem carrier protein</i>)
HFE	lidský homeostatický protein (z angl. <i>high Fe²⁺</i>)
HO	hemoxigenasa
HRI	hemem regulovaný inhibitor
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
IRE	responsivní elementy k regulačním proteinům železa (z angl. <i>iron responsive element</i>)
IRP	regulační proteiny železa (z angl. <i>iron regulatory proteins</i>)
KI	kinasová insertní
LB	Luria-Bertani
LIP	labilní zásobárna železa (z angl. <i>labile iron pool</i>)
Mb	myoglobin

Met	methionin
mRNA	mediátorová RNA
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PERK	ER kinasa podobná PKR (z angl. <i>PKR-like ER kinase</i>)
PKR	proteinkinasa závislá na dvouvláknové RNA (z angl. <i>protein kinase double-stranded RNA-dependent</i>)
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. <i>ribonucleic acid</i>)
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Ser	serin
TAE	Tris-HCl, acetát, EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin
TfR	transferrinový receptor
Thr	threonin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminoethan
tRNA	transferová RNA
tRNA _i ^{Met}	tRNA nesoucí methioninový zbytek
UTP	uridintrifosfát
A_λ	absorbance při vlnové délce λ (nm)
c_m	hmotnostní koncentrace
l	tloušťka absorpčního prostředí
M	mol dm^{-3}
M	molární hmotnost
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
$\varepsilon_{m,\lambda}$	hmotnostní absorpční koeficient při vlnové délce λ (nm)
ε_λ	molární absorpční koeficient při vlnové délce λ (nm)

ÚVOD

Hemové sensorové proteiny jsou skupinou hemoproteinů zajišťujících řadu významných funkcí v prokaryotických i eukaryotických organismech. Hlavním předmětem současného výzkumu je vysvětlení mechanismu přenosu signálu ze sensorové domény těchto proteinů do jejich funkční domény. Příkladem eukaryotického hemového sensorového proteinu je hemem regulovaný inhibitor (HRI), kinasa zajišťující fosforylaci α -podjednotky eukaryotického iniciačního faktoru 2 (eIF2 α) v rámci integrované stresové odpovědi. Původně byl tento protein objeven v retikulocytech, v nichž zajišťuje udržení poměru koncentrace hemu a globinu 1 : 1 prostřednictvím inhibice proteosyntézy. V současné době je však proteinu HRI připisována řada dalších funkcí, které otevírají zajímavé potenciální aplikační možnosti (např. cirkadiánní rytmy, zapojení do procesu karcinogeneze). Nezbytným předpokladem rozvoje této problematiky je však dostupnost proteinu HRI v dostatečném množství a čistotě, stejně jako dostupnost jeho substrátu, eIF2 α , pro další detailní studie jejich vlastností.

Hlavním cílem této bakalářské práce proto byla příprava proteinů HRI a eIF2 α rekombinantní expresí, jejich izolace a následná purifikace. Dalším záměrem byla pilotní charakterizace obou proteinů spolu s ověřením enzymové aktivity proteinu HRI. V neposlední řadě byla studována schopnost různých donorů fosfátu fosforylovat protein eIF2 α . V prvních dvou kapitolách teoretické části jsou shrnuty poznatky týkající se biologického významu železa a jeho vázaných forem, přičemž důraz je kladen na zavedení pojmů a konceptů používaných v dalším textu. Třetí kapitola teoretické části se zaměřuje na aktuální stav poznatků o proteinu HRI a jeho substrátu, eIF2 α .

1 Úvodní pojednání o železe

1.1 Železo v počátcích Země a pozemského života

„*J sme stvořeni z hvězdného prachu*“, pronesl slavný americký astronom a popularizátor vědy Carl Sagan [1]. S jeho myšlenkou se v různých obměnách setkáváme napříč tvorbou dalších vědců i umělců. Současné kosmologické představy se stále opírají o dvě přelomové studie z let 1948 a 1957, které vysvětlily vznik chemických prvků ve vesmíru jako dvoufázový proces. První z nich, článek běžně označovaný podle jmen autorů jako „ $\alpha\beta\gamma$ “ (Alpher, Bethe, Gamow), popisuje vznik prvních jader několik minut po Velkém třesku (^2H , ^3He , ^4He , ^6Li , ^7Li) [2]. Druhý článek („ B^2FH “ podle manželů Burbidgeových, Fowlera a Hoylea) vysvětluje původ těžších prvků jako výsledek stelární nukleosyntézy, tj. slučování lehkých jader za vzniku těžších, probíhající stovky tisíc let v hvězdných jádrech. Tímto způsobem vznikla jádra železa a lehčí ($Z \leq 26$). Fúze vedoucí k jádrům těžším než železo byla umožněna zejména díky explozím supernov [3].

V prvních etapách vývoje pozemského života železo sehrálo významnou roli zejména díky svým redoxním vlastnostem (viz oddíl 1.2), dostatečnému výskytu a dobré biologické dostupnosti. Původní atmosféra měla značně redukující vlastnosti, železo se proto vyskytovalo převážně ve formě Fe^{II} a molekulový kyslík produkovaný prvními fotosyntetizujícími kyanobakteriemi byl z většiny spotřebován oxidací Fe^{II} na Fe^{III} v oceánech [4]. Zvyšování koncentrace kyslíku v atmosféře však vedlo ke zhoršení biologické dostupnosti železa, protože jeho významný podíl byl srážen ve formě hydroxidu železitého, jak dokládají bohaté zásoby oxidu železitého v prekambriických nálezích [5]. Opačný vliv mělo zvýšení oxidačních vlastností atmosféry na dostupnost mědi, která byla převáděna z nerozpustné formy Cu^{I} na rozpustnou Cu^{II} , a mohla se tak stát součástí některých enzymů s vysokým redoxním potenciálem (např. ceruloplasmin, azurin [6]). Přesto zůstala interakce železa (i mědi) s kyslíkem fundamentálně důležitou pro formování současného života na Zemi.

1.2 Chemické vlastnosti železa

Železo se nachází uprostřed první přechodné řady, díky čemuž se vyznačuje značnou variabilitou oxidačních stavů (od $-II$ do $+VI$), přičemž nejčastější jsou oxidační čísla $+II$ (d^6) a $+III$ (d^5). S ostatními oxidačními čísly se setkáváme zejména v katalytických cyklech metaloenzymů (např. $+IV$, $+V$). Unikátnost redoxních vlastností pro biologické systémy je dána především možností regulace elektrodového potenciálu páru $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ v závislosti na koordinujících ligandech mezi hodnotami $-0,77$ V (enterobaktin [7]) až do $+0,70$ V (vysokopotenciální Fe–S proteiny [8]), přičemž standardní elektrodový

potenciál páru $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ je +0,77 V. Přitom oba kationty tvoří stabilní komplexy s celou řadou ligandů, vykazující rozmanité reakce spojené s přenosem elektronu nebo protonu. Tyto skutečnosti opět nabízí nesmírně bohaté možnosti využití pro živé systémy.

Primárním rozdílem mezi oběma kationty jsou jejich iontové poloměry – 67 pm v případě Fe^{3+} , 83 pm v případě Fe^{2+} [8]. Důsledkem je silnější polarizační účinek kationtu železitého, způsobující srážení jeho solí za vzniku hydroxidu železitého, a tedy omezenou rozpustnost těchto solí, zatímco soli železnaté bývají velmi ochotně rozpustné. Z pohledu koordinačních preferencí se kation železitý chová jako tvrdá kyselina, zatímco kation železnatý má vlastnosti přechodné mezi kyselinou tvrdou a měkkou – proto kation železitý upřednostňuje tvrdé ligandy (fenolát, karboxylát) a kation železnatý naopak ligandy měkčí (histidin, pyrrol, protoporfyrin, cystein) [8].

Oba kationty zaujímají převážně oktaedrická koordinační okolí. Významnou výjimkou jsou tetraedrické jednotky FeS_4 vyskytující se v Fe–S klastrech, jejichž stereochemie je určena převážně objemnými atomy síry [8]. V oktaedrickém poli jsou zastoupeny komplexy vysokospinové i nízko-spinové, přičemž pro kation železitý jsou běžnější komplexy nízko-spinové, jak odpovídá většímu kladnému náboji kationtu. Proteiny obsahující železo koordinované v oktaedrickém poli se liší obsazeností šestého koordinačního místa – proteiny zajišťující přenos a aktivaci malých molekul (O_2 , N_2) mívají šestou pozici volnou (hemoglobin, oxygenasy), zatímco proteiny určené pro elektronový přenos (cytochromy, ferredoxiny) nikoli. Možné elektronové konfigurace v oktaedrickém poli pro oba oxidační stavy jsou uvedeny Tabulce 1.

Tabulka 1: Elektronové konfigurace kationtů železnatého a železitého v nízko-spinovém a vysokospinovém uspořádání v oktaedrickém krystalovém poli.

	nízko-spinové uspořádání	vysokospinové uspořádání
$\text{Fe}^{2+} (d^6)$	$(t_{2g})^6(e_g)^0$	$(t_{2g})^4(e_g)^2$
$\text{Fe}^{3+} (d^5)$	$(t_{2g})^5(e_g)^0$	$(t_{2g})^3(e_g)^2$

1.3 Volné železo a jeho toxicita

Ačkoli byl nastíněn zásadní význam železa a zejména jeho interakce s kyslíkem pro život, přímá reakce kationtu železnatého s kyslíkem může vést k velmi toxickým produktům (tzv. kyslíkový paradox), především reaktivních kyslíkových částic, které mohou oxidovat řadu organických substrátů. Podobné riziko může představovat reakce kationtu železnatého s peroxidem vodíku (tzv. Fentonova reakce). Průběh těchto reakcí

je výrazně závislý na chelatujících ligandech, rozeberme proto nejprve možné mechanismy a poté je diskutujeme s ohledem na fyziologické podmínky.

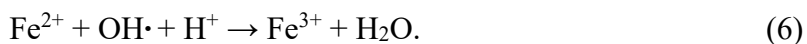
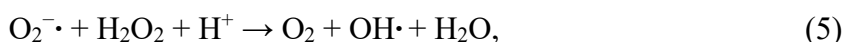
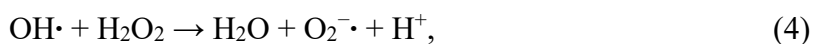
Přímá oxidace kationtu železnatého kyslíkem může být značně podpořena selektivní chelatací vznikajícího kationtu železitého (viz rovnice (1), (2)).



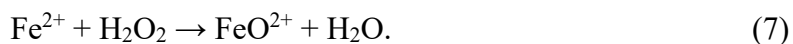
Reakce kationtu železnatého s peroxidem vodíku byla poprvé popsána Fentonem v roce 1876, který pomocí vzniklé směsi oxidoval vinnou kyselinu [9] a později vysvětlil, že železnatý kation hraje v reakci katalytickou roli [10]. Reakční mechanismus poprvé navrhli Haber a Weiss [11], přičemž jako meziprodukt identifikovali hydroxylový radikál vznikající podle rovnice (3):



V Haberově–Weissově mechanismu je peroxid vodíku spotřebováván řetězovou reakcí, Fentonova reakce (3) je tedy reakcí iniciační a je následována těmito kroky:



Alternativní popis mechanismu založený na vzniku ferrylového kationtu FeO^{2+} (viz rovnici (7)) byl poprvé publikován v roce 1949, přičemž o validitě obou mechanismů dosud nebyly učiněny jednoznačné závěry. V nejnovějším přehledovém článku Koppenol uvádí [12], že radikálový meziprodukt lze očekávat při nižším pH, zatímco ferrylový kation při vyšším pH, přičemž významnou roli hrají koordinující ligandy.



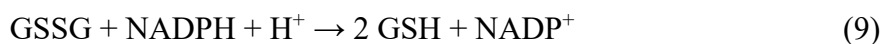
Bez ohledu na nesrovnalosti v reakčním mechanismu je zřejmé, že směs kationtu železnatého s peroxidem vodíku může působit jako silné oxidační činidlo pro řadu organických substrátů. Na jednu stranu se této skutečnosti využívá pro biologickou dekontaminaci odpadních vod [13], na druhou stranu však představuje pro živé organismy zásadní riziko možnou tvorbou reaktivních forem kyslíku [12].

Primárním způsobem ochrany organismů před těmito riziky je udržování velmi nízkých koncentrací volných iontů železa. Železo je proto z převážné části vázáno v proteinech, buď začleněné do porfyrinového kruhu jako hem, nebo spolu se sírou v tzv. Fe–S klastrech. V prostředí buňky je železo přenášeno na ferritin, přičemž přechodně může být

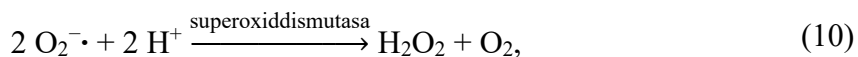
vázáno na chaperony označované jako poly(rC) vazebné proteiny 1 a 2. Další významnou skupinou jsou metaloproteiny, jejichž prostetickou skupinou je přímo kation železnatý či železitý (zejména proteiny zajišťující skladování a transport železa). Kromě všech jmenovaných vázaných forem je v cytosolu udržován malý podíl volného železa označovaný jako labilní zásobárna železa (LIP, z angl. *labile iron pool*) o přísně regulované přibližné koncentraci 1 μM [14].

Železo tvořící LIP je zastoupeno převážně ve formě kationtu železnatého, přičemž k jeho stabilizaci mohou přispívat dostupné ligandy. Chelatace volných iontů železa dosud není uspokojivě popsána [15], jejím hlavním účelem je však pravděpodobně zabránění průběhu popsaných reakcí s kyslíkem a s peroxidem vodíku, které vedou ke vzniku reaktivních forem kyslíku. Existence nadbytku kationtu železnatého nad železitým byla prokázána pomocí fluorescenčního značení [14], ale již dříve byla podložena mnoha argumenty – 1) kation železitý tvoří nerozpustné soli, 2) je mnohem méně kineticky labilní vůči ligandové výměně [16], 3) pro navázání kationtu železnatého do proteinů jsou potřebné koncentrace odpovídající přibližně koncentraci LIP [17] a 4) v neposlední řadě je v cytosolu udržováno redukující prostředí, čemuž odpovídá např. poměr redukované a oxidované formy nikotinamidadeninindinukleotidu [18].

Vysokou afinitu ke kationtu železnatému vykazují citrát a cystein, které napomáhají jeho stabilizaci, avšak jejich cytosolární koncentrace není dostačující pro inhibici jeho autooxidace [19]. Rozhodující úlohu plní glutathion, jehož redukovaná forma (GSH) reakcí (8) účinně brání akumulaci kationtu železnatého. Vzniklá oxidovaná forma glutathionu (GSSG) je zpětně regenerována na GSH glutathionreduktasou za účasti redukovaného nikotinamidadeninindinukleotidfosfátu (NADPH), viz rovnici (9) [19].



Ochranu před reaktivními formami kyslíku, které by mohly vzniknout výše popsanou Fentonovou reakcí kationtu železnatého s peroxidem vodíku, představují zejména enzymy superoxiddismutasa a katalasa, které vznikající formy kyslíku udržují v extrémně nízkých koncentracích [15]. Riziko oxidativního stresu je však nutné brát v úvahu při zvýšeném příjmu železa, zejména v souvislosti s užíváním potravinových doplňků [20].



Podobně i v extracelulárním prostředí je železo vázáno do proteinů, z nichž nejvýznamnějším je transportní transferrin. Ionty železa (železnaté i železitě), které neinteragují s transferrinem, se v krevní plasmě nachází v měřitelných koncentracích pouze při patologickém nadbytku železa, u zdravých jedinců jsou však zastoupeny např. v intrasticiální tekutině v nervové tkáni [21]. Oba kationty mohou být vázány také v albuminu [22].

1.4 Hospodaření se železem

V této části nejprve rozeberme příjem železa v jednotlivých formách spolu se souvisejícími aspekty, dále pak procesy ukládání a uvolňování železa do a z forem určených k jeho uskladnění a transportu. Vzájemné synchronizaci těchto dějů s důrazem na regulaci v souladu s potřebami jednotlivých tkání bude věnována pozornost v oddílu 1.5 (s. 17).

1.4.1 Formy železa v potravě

Formy železa přijímané v potravě se standardně rozdělují do dvou skupin – železo hemové a nehemové, přičemž druhá skupina je tvořena převážně kationtem železitým v různých formách. Zásadní nevýhodou nehemového železa je špatná rozpustnost solí železitých, která vzhledem k přítomnosti srážejících aniontů činí jeho vstřebávání náročnějším (např. fosfáty, polyfenoly, fytáty [23]). Protože střevní buňky jsou schopny přijímat pouze kation železnatý [23], může být kation železitý vstřebán buď volný po redukci na kation železnatý, nebo jako součást komplexu s tzv. sideroforem. Redukce je umožněna po solubilizaci kationtu železitého kyselým prostředím žaludku [24]. Jako významný siderofor působí askorbová kyselina, která s kationtem železitým vytváří rozpustný komplex a usnadňuje jeho následnou redukci [23]. Askorbová kyselina je vedle příjmu z potravy aktivně secernována do žaludečních šťáv [25].

1.4.2 Absorpce a distribuce jednotlivých forem železa

Železo je z potravy absorbováno v duodenu a v horní části jejunu [26]. Enterocyty jsou schopny přijímat železo v hemu pomocí hemového transportního proteinu 1 (HCP 1, z angl. *haem carrier protein*) [27], přičemž přijatý hem je rozkládán hemoxygenasou 1 (HO 1) za uvolnění kationtu železnatého, oxidu uhelnatého a biliverdinu (viz oddíl 2.2.3, s. 25). Nehemový kation železitý je nejprve redukován na apikální membráně enterocytů ferrireduktasou (duodenální cytochrom *b*) [28], teprve poté je možný jeho vstup do buňky pomocí přenašeče dvojmocných kationtů 1 (DMT 1, z angl. *divalent metal transporter*). DMT 1 využívá gradientu protonů mezi střevním lumenem a cytosolem enterocytu k symportu protonů a dvojmocných kationtů kovů (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+}) [29]. Dodejme,

že nezávisle na předchozích formách je možný příjem ferritinu endocytosou prostřednictvím adaptorového proteinu 2, během níž dochází k redukci přítomného kationtu železitého [30].

Železo absorbované v enterocytech se stává součástí LIP, odkud může být využito k začlenění do cytosolárních apoproteinů – zejména do zásobního ferritinu, přičemž tento přenos je usnadněn poly(rC) vazebnými proteiny 1 a 2 [31]. Ferritin je tvořen 24 podjednotkami dvou typů – těžká podjednotka H (z angl. *heavy*) má ferroxidasovou aktivitu a oxiduje dva kationty železnaté na železité, lehká podjednotka L (z angl. *light*) umožňuje jejich zabudování do jádra proteinu [32]. Alternativně může být železo transportováno pomocí mitoferrinu 1 a 2 do mitochondrií [33], kde je využito k syntéze hemu a Fe–S klastrů. Nadbytečný ferritin může být degradován na nerozpustný hemosiderin, typicky vznikající při jaterní cirhóze [34].

Enterocyt přežívá pouze po dobu několika dní, železo v něm vázané by tedy bylo kontinuálně odváděno stolicí. Z tohoto důvodu je potřebné odvedení železa do krevní plasmy, kde je po oxidaci na kation železitý zabudováno do transportního transferrinu. Kation železnatý je transportován ferroportinem 1 na bazální membráně enterocytu [35]. Oxidaci na kation železitý po exportu zajišťují proteiny z rodiny multiměďných oxidas – v případě enterocytů se jedná o hefestin, který je součástí bazální enterocytární membrány [36]. Jeho sérový analog ceruloplasmin zajišťuje oxidaci kationtu železnatého po exportu ze zásobních buněk [37].

Všem buňkám je společný příjem železa z transferrinu z krevní plasmy. V případě enterocytů byly dále zmíněny transportéry DMT 1 a HCP 1 umožňující absorpci kationtu železnatého a hemu. Zásadní důležitost má také absorpce hemu v monocytech a makrofázích, která probíhá buď uvolněním v lysosomech makrofágů po fagocytose, nebo příjmem hemoglobinového–haptoglobinového komplexu pomocí receptoru CD163 (z angl. *cluster of differentiation*) [38].

Transferrin je buňkami přijímán po navázání na transferrinový receptor 1 (TfR 1) mechanismem klathrin-dependentní endocytosy. V endosomu je působením protonové pumpy sníženo pH na 5–6 (snížení pH umožňuje uvolnění železitého kationtu, který je v transferrinu vázán extrémně pevně [24]). Kation železitý je redukován pomocí ferrireduktasy Steap3 a vznikající kation železnatý je z endosomu do cytosolu převeden pomocí DMT 1 [39]. Uvolněné železo se opět stává součástí LIP, je zabudováno do apoproteinů (např. apoferritinu), či transportováno mitoferriny do mitochondrií. Apotransferrin si i za nízkého pH zachovává vysokou afinitu k TfR, může se tedy na membránu znovu navázat k exportu do krevního oběhu [40].

Kromě železa získaného z potravy nebo uvolněného z transferrinu má zásadní význam regenerace kationtu železnatého obsaženého v zanikajících erythrocytech [41]. Erythrocyty jsou rozpoznávány a fagocytovány monocyto–makrofágovým systémem sleziny a jater. V lysosomech makrofágů dochází k uvolnění hemu a jeho degradaci působením HO 1, vedoucí k uvolnění kationtu železnatého, oxidu uhelnatého a billiverdinu [42]. Dalším zdrojem železa pro makrofágy je plasmatický hemoglobin, který je přijímán ve formě hemoglobinového–haptoglobulinového komplexu prostřednictvím receptoru CD163 [38].

1.5 Regulace hospodaření se železem

Celkový obsah železa v lidském těle se pohybuje mezi 3–4 g, z nichž 65 % je obsaženo v erythrocytech [43]. Protože doba života erythrocytů trvá přibližně 120 dní a erythropoesou vzniká denně přibližně $2 \cdot 10^{11}$ nových erythrocytů, je většina potřebného železa v organismu recyklována [44]. Denně je z potravy přijato 1–2 mg železa, přičemž toto množství je přibližně vyrovnáno ztrátami potem, epitelovými buňkami a vlasy, popř. menstruačním krvácením [45]. Protože neexistují žádné způsoby metabolické konverze železa, regulace jeho množství je možná pouze na základě řízení duodenální absorpce a uvolňování z makrofágů a zásobních buněk. Tyto procesy jsou koordinovány jednak na systémové, jednak na buněčné úrovni. Charakterizujme stručně obě možnosti spolu s nejvýznamnějšími mechanismy jejich realizace.

1.5.1 Systémová regulace

Rozhodující úlohu v systémové regulaci hladiny železa má jaterní hormon hepcidin, jehož účinek byl popsán v roce 2004 [46]. Hepcidin je kódován genem *HAMP* a je syntetizován ve formě preproteinu, z něhož aktivní forma vzniká proteolytickým štěpením za účasti furinu [46]. Hepcidin se váže na ferroportin a způsobuje jeho internalizaci, čímž blokuje jeho exportní funkci. Železo absorbované enterocyty tak není převedeno do krevní plasmy a odchází ve stolici. Stejným způsobem je zabráněno uvolnění železa z ferritinových zásob v hepatocytech a makrofázích [47].

Při zvýšené hladině železa v krevní plasmě je proto stimulována produkce hepcidinu, při jeho nedostatku je naopak blokována. Mimoto je sekrece hepcidinu řízena i dalšími fyziologickými podněty. Zvýšení sekrece může být způsobeno průběhem erythropoesy vyžadující uvolnění železa ze zásob [48], popř. působením zánětů a infekcí za účelem omezení dostupnosti železa pro mikroorganismy [47]. Snížení sekrece bývá vyvoláno především stavem hypoxie [49]. Exprese genu *HAMP* je regulována na základě signálu

senzorových proteinů na povrchu hepatocytů, z nichž nejvýznamnějším je hemojuvelin, dále pak protein lidský homeostatický protein (HFE, z angl. *high Fe²⁺*) a TfR 2.

Hemojuvelin je koreceptorem pro kostní morfogenetické proteiny (BMP, z angl. *bone morphogenetic proteins*), které se vedle řízení růstu podílí i na homeostáze železa. Interakce BMP s hemojuvelinem a BMP–receptorem vyvolá fosforylaci cytosolárních regulačních proteinů označovaných akronymem Smad 1, 5 a 8, které jsou ve formě komplexu se Smad4 transportovány do jádra, kde se váží na BMP–responsivní elementy v oblasti *HAMP* promotoru, čímž vyvolávají jeho transkripci [50].

TfR 1 obsahuje vazebná místa pro transferrin a pro protein HFE, přičemž pro transferrin má tento receptor vyšší afinitu. Za normálních podmínek je protein HFE vázán k TfR 1, při zvýšené hladině železa však dochází k jeho uvolnění z TfR 1 a navázání na TfR 2. Vzniklý komplex HFE–TfR 2–transferrin aktivuje expresi *HAMP* za účasti extracelulárních signálně regulovaných kinas 1 a 2 [51].

Zvýšení hladiny hepcidinu může být při infekci či zánětu vyvoláno za účelem omezení proliferace mikroorganismů závislých na příjmu železa od hostitele. Makrofágy po rozpoznání patogenů secernují interleukin 6 a 22 a interferon typu 1. Tyto cytokiny po rozpoznání receptory na povrchu hepatocytů a leukocytů aktivují transkripci faktoru Stat3. Faktor Stat3 se koordinuje do vazebných míst v oblasti *HAMP* promotoru, čímž stimuluje jeho expresi [52].

V případě hypoxie má hlavní úlohu v regulaci železa transkripční faktor indukovaný hypoxií, schopný reagovat na hladinu kyslíku. Za normálního stavu jsou všechny podjednotky tohoto proteinu určeny k degradaci v proteasomu [53]. Ve stavu hypoxie jsou podjednotky stabilizovány a interagují s elementy responsivními na hypoxii, které kódují řadu proteinů – transferrin, TfR 1, TfR 2, ceruloplasmin či preprotein erythropoetinu, hormonu, který následně stimuluje erythropoese [54].

1.5.2 Buněčná regulace

Vedle systémové regulace hepcidinem existují specifické mechanismy, kterými mohou jednotlivé buňky řídit hospodaření se železem, obvykle na úrovni exprese genů produkujících proteiny zapojené do hospodaření se železem (transkripce, translace, posttranskripční a posttranslační modifikace).

Nejvýznamnějším příkladem je systém regulačních proteinů železa a jejich responsivních elementů (IRP/IRE, z angl. *iron-regulatory proteins, iron-responsive elements*) založený na interakci proteinů IRP 1 a IRP 2 s elementy v nepřekládaných 5' a 3' oblastech mediátorové ribonukleové kyseliny RNA (mRNA) kódujících proteiny zajišťující příjem

(DMT 1, TfR 1), ukládání (transferrin) a export železa (ferroportin 1) [55]. Při nedostatku železa se IRP 1 váže na IRE a stimuluje translaci příslušné mRNA, zatímco při jeho nadbytku je vazebné místo pro IRP 1 obsazeno klastrem $[Fe_4S_4]$ [56]. Podobně se při nedostatku železa váže na IRE také IRP 2, který je naopak při nadbytku železa podroben proteasomální degradaci [57].

Na úrovni transkripce je řízena exprese DMT 1, ferroportinu 1 a TfR 2, jejichž geny obsahují více iniciačních bodů pro regulaci různými promotory [58-60]. Dále jsou uplatňovány mechanismy posttranskripční regulace, např. alternativní polyadenylace ovlivňující stabilitu mRNA (např. u IRP 2 [61], HFE [62]). Regulace exprese HFE je řízena i alternativními sestřihy vedoucími k různým transkriptům [63], podobně jako v případě DMT 1 [64] a ceruloplasminu [65]. Translace některých genů je také inhibována působením mikro RNA. V neposlední řadě je možná regulace konvertas zajišťujících proteolytické štěpení neaktivních forem zapojených proteinů, např. TfR 1 [66] a hemojuvelinu [50].

2 Vázané formy železa

Celkový obsah železa v lidském organismu se pohybuje mezi 3–4 g [67]. V předchozí kapitole byly rozebrány toxické účinky volných iontů železa, z nichž vyplývá nutnost ochrany organismu tvorbou komplexů těchto iontů s vhodnými ligandy. Pro účely tohoto textu jsou jako vázané formy železa nejprve představeny nehemové proteiny, větší pozornost je však v dalších oddílech věnována hemu a hemoproteinům.

2.1 Nehemové proteiny

2.1.1 Fe–S proteiny

Evolučně starší vázanou formou železa jsou proteiny obsahující vazbu Fe–S (Fe–S proteiny). Železo může být v těchto proteinech vázáno thiolovými skupinami cysteinových postranních řetězců, nebo ve formě klastrů, v nichž je koordinováno atomem síry z aniontu sulfidového, popř. z cysteinového zbytku [68]. Fe–S klastry jsou nejstaršími anorganickými kofaktory proteinů vůbec [69], přičemž nejhojněji zastoupeným je kubický klastr $[\text{Fe}_4\text{--S}_4]$. Dalšími typickými motivy jsou rhombický klastr $[\text{Fe}_2\text{--S}_2]$ a klastr $[\text{Fe}_3\text{--S}_4]$, který se vyskytuje ve formě lineární nebo kubické.

Ion železa může v těchto proteinech měnit svůj elektrodový potenciál v rozmezí –500 až 300 mV, díky čemuž se tyto proteiny mohou uplatňovat jako donory i akceptory elektronů, v rámci řady katalytických a regulačních procesů. Hlavními příklady Fe–S proteinů jsou fotosystém I, ferredoxiny, hydrogenasy a komplexy I–III dýchacího řetězce [68].

2.1.2 Ferritin

Ferritin je intracelulární sférický protein, který zajišťuje skladování a uvolňování zásob železa. Je tvořen 24 podjednotkami typů H a L, přičemž podjednotka H vykazuje ferroxidasovou aktivitu (oxiduje kation železnatý na železitý) a podjednotka L zprostředkovává tvorbu nukleárních center pro depozici oxidovaného železa a růst krystalického ferrihydritu, který je uchován v jádře proteinu [68]. Ferritin je lokalizován v cytosolu, jádře, mitochondriích a lysosomech, v omezené míře je sekretován i do krevní plasmy [70]. Při nadbytku ferritinu dochází v lysosomech k agregaci ferritinových jader za vzniku nerozpustného hemosiderinu [70].

2.1.3 Transferriny

Glykoproteiny zastoupené v živočišných tělních tekutinách schopné reverzibilně vázat ionty železa tvoří proteinovou rodinu tzv. transferrinů. Transferriny bývají tvořeny 680–700 aminokyselinami, v nichž vykazují 60–80% homologii a bývají uspořádány

do dvou laloků [71]. Vedle udržování homeostázy železa se podílejí na inhibici bakteriálního růstu [72]. Nejvýznamnějším zástupcem je lidský sérový transferrin (serotransferrin, siderofilin), který zajišťuje distribuci železa do jednotlivých tkání. Vedle sérového transferrinu zmíníme transferriny dalších sekretů – např. laktoferrin zastoupený v mateřském mléce (s prokázanými antioxidačními a protizánětlivými účinky) a ovotransferrin, přítomný ve vaječném bílku (řadí se mezi proteiny tepelného šoku) [73].

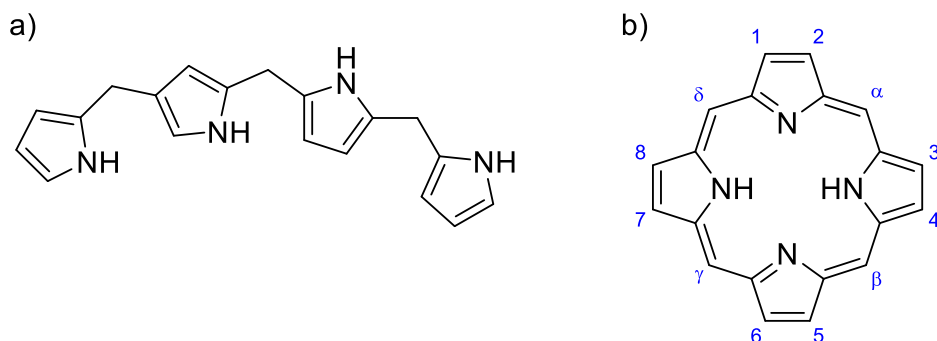
Sérový transferrin je z největší části produkován hepatocyty. Každý z jeho laloků se skládá ze dvou domén, vzájemně propojených antiparalelními β strukturami, v jejichž dutinách se nachází vazebné místo pro jeden kation železitý. Jedna molekula transferrinu je tak schopna vázat dva kationty železité. Pro vazbu iontu železa je nezbytná přítomnost aniontu uhličitanového, který zeslabuje repulzní účinek kladně nabitých aminokyselinových zbytků. [74]

2.2 Hem

2.2.1 Struktura a názvosloví porfyrinů

Významnou skupinou přírodních barviv jsou sloučeniny obsahující čtyři pyrrolová jádra, obecně nazývané tetrapyrroly. Jádra bývají spojena jednouhlíkovými můstky $=CH-$ (methenyl) nebo $-CH_2-$ (methylen) do lineárního, nebo cyklického uspořádání. Názvosloví těchto sloučenin se původně řídilo návrhem vydaným Fischerem v roce 1937 [75], v současné době je upraveno doporučením vydaným v roce 1988 Komisí pro biochemickou nomenklaturu při Mezinárodní unii pro čistou a užitou chemii [76].

Základem pro názvosloví lineárních tetrapyrrolů je bilan, pro cyklické tetrapyrroly porfyrin (podle původního Fischerova názvosloví porfín). Vzorce těchto sloučenin jsou znázorněny na Obrázku 1, přičemž ve struktuře porfyrinu je uvedeno dosud užívané číslování jednotlivých jader a můstků, pocházející od Fischera.

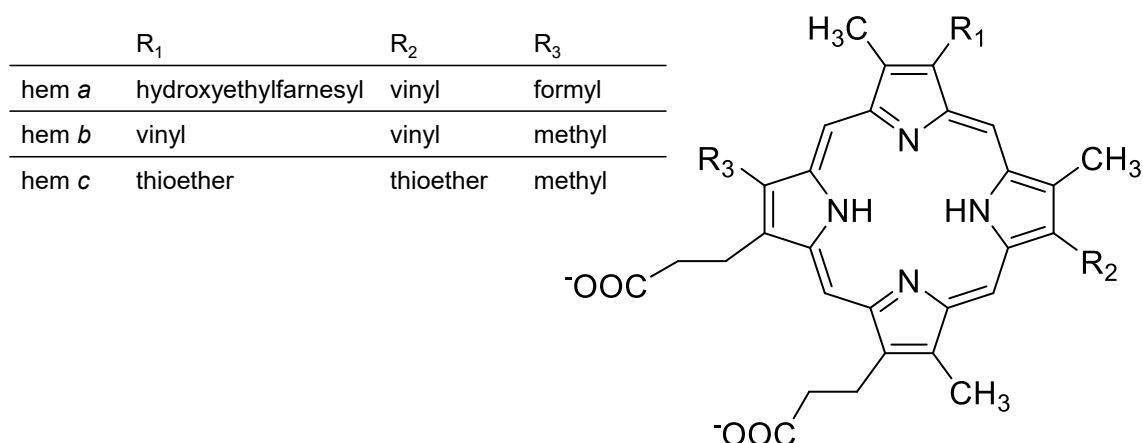


Obrázek 1: Strukturní vzorce a) bilanu, b) porfyrinu (sloučeniny jsou základem názvosloví lineárních resp. cyklických tetrapyrrolů). Číslování porfyrinu se řídí původním Fischerovým názvoslovím.

Nejvýznamnějšími zástupci lineárních tetrapyrrolů jsou žlučová barviva – jednak produkty katabolismu hemu (bilirubin, biliverdin), jednak fotosyntetické pigmenty některých kyanobakterií a řas (fykocyanin, fykoerythrobilin) [77]. Cyklické tetrapyrroly (označované také jako porfyriny, v komplexu s kovovým iontem jako metaloporfyriny) se liší především substituenty na pyrrolových jádrech, nasyceností, popř. také počtem jednonuhlíkových můstků.

V novém doporučení k názvosloví tetrapyrrolů byla zachována řada triviálních názvů, o které se opírá také Fischerova klasifikace porfyrinových derivátů podle substituentů na pyrrolových jádrech. Základní porfyrinové kruhy (mesoporfyrin, deuteroporfyrin, hematoporfyrin a protoporfyrin) byly Fischerem rozděleny do tříd označených římskými číslicemi I–XV podle přítomných substituentů, z nichž nejčastější jsou methyl, vinyl, propionát a acetát [76]. Makrocyclus tvořící základ struktury hemu se podle této klasifikace nazývá protoporfyrin IX (viz dále), z dalších používaných názvů zmíníme pouze nejvýznamnější – chlorin (2,3-dihydroporfyrin, koordinuje kation hořečnatý v chlorofylu), korrin (na rozdíl od předchozích má tři methenylové můstky namísto čtyř, koordinuje kobalt v kobalaminu) a sirohydrochlorin (tetrahydroporfyrin, koordinuje kation železnatý v sirohemu) [77].

Hem je podle zmíněného doporučení [76] obecným názvem pro komplex protoporfyrinu IX a kationtu železa (bez rozlišení oxidačního stavu kovu). Pro specifikaci oxidačních čísel je doporučeno užívat názvů ferrohem (komplex s kationtem železnatým) a ferrihem (komplex kationtem železitým). Používán je také termín hemin, který označuje komplex obsahující kation železitý a chloridový anion. Obecnou strukturu hlavních typů hemu (*a*, *b*, *c*) znázorňuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Strukturní vzorec hemu *a*, *b*, *c*.

Nejvýznamnější typem je hem *b*, který je nekovalentními interakcemi poután v hemoglobinu, myoglobinu, peroxidasach a cyklooxygenasach a je prekurzorem pro syntézu dalších typů hemu. Hem *c* je součástí cytochromů *c*, v nichž je vázán kovalentně (tvoří pomocí vinylových zbytků thioetherové vazby na cystein) [78]. Hem *a* se nachází v cytochrom *c* oxidase a obsahuje isoprenoidní hydroxyethylfarnesylovou skupinu. Mimo tři hlavních typů hemů existují další, méně obvyklé – hem *m* (součást myeloperoxidasy), hem *I* (součást některých peroxidas) a hemy přítomné ve specifických bakteriálních enzymech, např. hem *d*₁ (cytochrom *cd*₁ reduktasa), hem *d* (cytochrom *d* oxidasa) a hem *o* (cytochrom *bo*₃) [78], [79].

Podobně jako nevázané kationty železa má i volný hem toxické účinky, své nezastupitelné biologické role proto sehrává jako kofaktor hemoproteinů. Toxické účinky byly popsány zejména v souvislosti s masivními hemolýzami provázejícími některé patologické stavy a onemocnění (srpkovitá anemie, reperfuse, malárie) [80]. Organismus je před náhlým uvolněním hemu chráněn rozkladem hemu působením HO, popř. jeho zachycením do plasmatického proteinu – zejména hemopexinu, který hem transportuje k degradaci v retikuloendoteliálním systému jater [81]. Na odstranění nadbytečného hemu se dále podílí albumin [82] a glutathion [83].

Při přetížení těchto ochranných mechanismů dochází k akumulaci hemu, který způsobuje tvorbu reaktivních forem kyslíku reakcemi popsány v oddílu 1.3 (s. 12), a vyvolává tedy oxidativní stres [84]. Díky hydrofobnímu charakteru je hem schopen interkalace do buněčné membrány erythrocytů [85], kde interakcemi s přítomnými lipidy a proteiny znemožňuje regulaci osmotické rovnováhy, a způsobuje tak další hemolýzu. Mimoto je nadbytečný hem schopen působit prozánětlivě (aktivací leukocytů, zvýšením propustnosti cév a aktivací transkripčních faktorů vedoucí k tvorbě endoteliálních intracelulárních adhezních molekul) [86].

Závěrem dodejme, že díky přítomnosti konjugovaného systému dvojných vazeb vykazují porfyrinové systémy absorpci ve dvou charakteristických oblastech elektromagnetického spektra. Výraznou absorpci vykazují v tzv. Soretově oblasti (B pásy) v intervalu vlnových délek 380–500 nm, méně intenzivní jsou pak tzv. Q pásy v oblasti 500–700 nm [87]. Absorpce v Soretově oblasti odpovídá přechodu $S_0 \rightarrow S_2$, Q pásy odpovídají energeticky méně náročnému přechodu $S_0 \rightarrow S_1$ [88]. Protože polohy a intenzity absorpčních maxim jsou výrazně ovlivněny spinovým stavem koordinovaného iontu kovu, substituenty vázanými na porfyrinový makrocyclus a v neposlední řadě působícími nekovalentními interakcemi, má analýza Soretových pásů a Q pásů zásadní význam pro studium interakcí porfyrinů s biomakromolekulami [87].

2.2.2 Biosyntéza hemu

Podstatou biosyntézy hemu ze základních prekurzorů je tvorba pyrrolového jádra, kondenzace čtyř pyrrolových jader do lineárního řetězce, uzavření porfyrinového cyklu a závěrečná koordinace kationtu železnatého. Prvním meziproduktem syntézy je δ -aminolevulová kyselina (ALA, z angl. *aminolevulic acid*), která vzniká dvěma možnými způsoby, označovanými jako C4 cesta (uplatňovaná u rostlin, řas a většiny bakterií) a C5 cesta (též Sheminova cesta, typická pro živočichy a houby) [79]. Prekurzorem C4 cesty je glutamyl-tRNA, jejíž redukcí vzniká glutamát-1-semialdehyd-tRNA, z něž následnou mutasovou reakcí vzniká ALA. C5 cesta je založena na kondenzaci sukcinyl-CoA a glycinu podle rovnice (12). Rozeberme nyní stručně jednotlivé kroky, které se uplatňují při syntéze hemu v lidském organismu.

Prvním krokem je tvorba ALA podle rovnice (12), která probíhá v mitochondriích za účasti aminolevulinátsynthas (ALAS 1, ALAS 2). ALAS 1 je konstitutivní isoenzym, přítomný zejména v játrech, zatímco ALAS 2 je isoenzym specifický pro erythrocyty [89]. Oba isoenzymy se vyskytují ve formě homodimeru a jejich kofaktorem je pyridoxalfosfát [79]. Protože tvorba ALA je rychlost určujícím stupněm biosyntézy hemu, jsou ALAS zapojeny do řady regulačních mechanismů souvisejících s koncentrací hemu a železa. Uvolněná ALA přechází z mitochondrií do cytosolu, kde probíhají čtyři další kroky syntézy [79].



V cytosolu nejprve kondenzují dvě molekuly ALA za vzniku porfobillinogenu působením porfobillinogensynthasy (též aminolevulinátdehydratasy). Porfobillinogensynthasa je homooktamerní enzym a na každou podjednotku je vázán zinečnatý kation, přičemž čtyři kationty zinečnaté zodpovídají za stabilizaci struktury enzymu a čtyři zbylé se účastní katalytického cyklu [90].

Následně jsou čtyři molekuly porfobillinogenu spojeny do lineárního řetězce hydroxymethylbilanu činností porfobillinogendeaminasy. Kofaktorem porfobillinogendeaminasy je dipyrromethan, vznikající kondenzací dvou molekul porfobillinogenu. Během reakce tedy nejprve vzniká lineární řetězec složený ze šesti porfobilliongenových jednotek, a poté je uvolněn hydroxymethylbilan za současné regenerace dipyrromethanu [91].

Lineární hydroxymethylbilan je nestabilní a může podlehnout spontánní cyklizaci za vzniku uroporfyrinogenu I, který se však nemůže zapojit do dalších kroků syntézy [92]. Hydroxymethylbilan je proto cyklizován působením uroporfyrinogensynthasy

a uroporfyrinogenisomerasy za tvorby kýženého uroporfyrinogenu III [93]. Jeho dekarboxylací za katalýzy uroporfyrinogendekarboxylasou vzniká koproporfyrinogen III (čtyři acetátové zbytky na pyrrolových jádrech jsou převedeny na zbytky methylové), který je transportován zpět do mitochondrie [94].

Poslední kroky biosyntézy hemu jsou zprostředkovány enzymy asociovanými s vnitřní mitochondriální membránou [79]. Prvním z nich je koproporfyrinogen III oxidasa, která zajišťuje oxidativní dekarboxylaci dvou propionylových zbytků na zbytky vinylové za tvorby protoporfyrinogenu IX, přičemž jako akceptor elektronů slouží molekula kyslíku [95]. Druhým je protoporfyrinogen IX oxidasa, jejímž působením dochází k dokončení syntézy porfyrinového kruhu odštěpením šesti atomů vodíku, a tedy k vytvoření systému konjugovaných dvojných vazeb [96]. Kofaktorem elektronového přenosu je flavinadenindinukleotid a akceptorem elektronů opět tři molekuly kyslíku, které jsou redukovány za vzniku peroxidu vodíku [97]. Vzniklý protoporfyrin IX je substrátem posledního enzymu, ferrochelatasy, která zajišťuje koordinaci kationtu železnatého s využitím nezbytné distorze planárního porfyrinového kruhu. Vzniklý finální produkt, hem, je opět plně planární [98].

2.2.3 Katabolismus hemu

Klíčovým enzymem katabolismu hemu je HO, která zajišťuje rozklad hemu v mikrosomech za vzniku billiverdinu, oxidu uhelnatého a kationtu železnatého [99]. HO se vyskytuje ve dvou isoformách – HO 1, která je indukovatelná (hemem, ionty kovů, hormony, oxidativním stresem, teplotním šokem aj.), vysoce exprimovaná v játrech a ve slezině, a HO 2, která je konstitutivní, a je exprimována zejména v mozku a ve varlatech [100].

V první části reakčního mechanismu dochází k otevření porfyrinového kruhu, které je umožněno postupnými reakcemi α můstku se třemi molekulami kyslíku [101]. Současně dochází k odštěpení molekuly oxidu uhelnatého. Tyto reakce probíhají za účasti donoru elektronů (např. NADPH–cytochrom P450 reduktasy), který přenáší elektrony na hem i na vznikající intermediáty, čímž je aktivuje pro reakci s molekulou kyslíku. Vzniklý billiverdinový komplex uvolňuje kation železnatý a následně je působením billiverdinreduktasy redukován na bilirubin [101].

2.3 Hemoproteiny

Hemoproteiny je obecné označení pro skupinu proteinů s molekulou hemu jako kofaktorem, který jim propůjčuje role v řadě zásadních biologických procesů. Pro účely tohoto textu je využito dělení na a) hemoproteiny přenášející (a uskladňující) kyslík,

b) hemoproteiny s enzymovou (oxidoreduktasovou) aktivitou asociovanou s hemem, c) hemoproteiny zajišťující elektronový přenos, d) hemové sensorové proteiny, které využívají reverzibilní vazby hemu a podílí se na řadě intracelulárních signálních drah.

Hemoproteiny mohou zaujímat různá prostorová uspořádání (α -helix, β -skládaný list, popř. kombinace) a obsahovat různé počty vazebných míst pro hem [102] – hovoříme o hemoproteinech s pentakoordinovaným, nebo hexakoordinovaným iontem železa hemu (čtyři vazebná místa jsou obsazena atomy dusíku porfyrinového skeletu). V prvním případě je v koordinační sféře iontu železa ponecháno volné místo pro vazbu ligandu, jímž je často molekula plynu. Tento motiv je proto typický pro proteiny přenášející a uskladňující kyslík, jakož i pro senzory plynů. Naopak motiv hexakoordinovaného kationtu je typický pro elektronové přenašeče, redoxní senzory a senzory molekuly hemu.

2.3.1 Hemoproteiny zajišťující přenos a uskladnění kyslíku

Do přenosu a uskladnění kyslíku jsou v lidském organismu zapojeny dva hlavní proteiny – hemoglobin (Hb) a myoglobin (Mb). Klíčovou vlastností obou proteinů je schopnost reverzibilně vázat molekulu kyslíku a chránit koordinovaný kation železnatý v hemu před oxidací po navázání molekuly kyslíku [103]. Mb je monomerní protein schopný vázat jednu molekulu kyslíku, zatímco Hb je tvořen čtyřmi podjednotkami (dvě α a dvě β podjednotky), z nichž každá obsahuje molekulu hemu jako prostetickou skupinu. Celkem je tak Hb schopen koordinovat čtyři molekuly kyslíku [103]. Uvedené struktury obou proteinů byly popsány pomocí rentgenostrukturní analýzy v roce 1958 (Mb [104]) a 1960 (Hb [105]).

Charakteristickou vlastností Hb je kooperativita jeho podjednotek, jejímž projevem je a) pozitivní homotropní allosterický efekt, tj. rostoucí afinita ke kyslíku při přechodu z deoxyformy na oxyformu, b) negativní heterotropní allosterický efekt, tj. snížení afinity ke kyslíku po navázání některých efektorů (H^+ , Cl^- , 2,3-bisfosfoglycerát). První jmenovaný efekt je důvodem funkčního rozdílu mezi Hb a monomerním Mb – závislost saturace kyslíkem na parciálním kyslíku je v případě Hb sigmoidální, zatímco v případě Mb hyperbolická, čemuž odpovídá skutečnost, že funkcí Mb je uskladňování kyslíkových zásob ve svalech, zatímco Hb zajišťuje transport kyslíku mezi jednotlivými tkáněmi. Druhý efekt byl poprvé vysvětlen na efektoru H^+ jako tzv. Bohrův efekt, tj. schopnost Hb uvolňovat v tkáních o nízkém pH potřebný kyslík a v plicích o vyšším pH kyslík naopak snadno vázat. Těmto obdivuhodným schopnostem Hb byla věnována značná pozornost v 70. letech, přičemž tehdejší poznatky o vzájemném vztahu struktury a funkčních vlastností Hb byly shrnuty v přehledovém článku Baldwina a kol. [106].

Hlavní a dosud uznávanou představou o strukturně-funkčních vztazích Hb je existence jeho dvou stabilních konformerů, označovaných jako T (deoxyforma, z angl. *tense*) a R forma (oxyforma, z angl. *relaxed*). V T formě je kation železnatý ve vysokospinovém stavu a páte vazebné místo je obsazeno tzv. proximálním histidinem (čtyři koordinační vazby iontu železa jsou vytvořeny s atomy dusíku porfyrinového skeletu). Po navázání molekuly kyslíku jako šestého ligandu dochází k částečnému elektronovému přenosu, přičemž mezní stav odpovídá koordinaci nízkospinového kationtu železitého s aniontem superoxidovým [107]. Díky zmenšení iontového poloměru kationtu železa dochází k jeho posunu do roviny porfyrinového skeletu, zkrácení vazeb Fe–N a stabilizaci koordinovaného aniontu superoxidového tzv. distálním histidinem.

Podstatnou roli hrají během koordinace kyslíku také solné můstky stabilizující strukturu T formy (šest můstků propojujících jednotlivé podjednotky tetrameru, 4 typu α_1 – α_2 , dále 1 α_1 – β_2 a 1 α_2 – β_1) které jsou přerušeny vlivem konformačních změn vyvolaných koordinací. Z toho důvodu je přechod do R formy endergonický, což odpovídá vyšší afinitě R formy ke kyslíku [108]. Zároveň jsou tyto můstky schopné vázat protony, díky čemuž je afinita Hb ke kyslíku snížena v prostředí o nízkém pH (Bohrův efekt) [109].

2.3.2 Hemoproteiny s enzymovou (oxidoreduktasovou) aktivitou

Hlavní hemoproteiny zajišťující katalýzu redoxních reakcí jsou cytochromy P450 a cytochrom *c* oxidasa, vedle nichž jsou významné zejména peroxidasy a katalasy [102]. Pro tento typ proteinů je rovněž typická přítomnost pentakoordinovaného iontu železa hemu, která zpřístupňuje šesté vazebné místo pro koordinaci molekuly kyslíku, peroxidu vodíku, nebo pro tvorbu vazby Fe–C s přeměňovaným substrátem [68]. Aktivace těchto molekul je založena na schopnosti kationtu železnatého tvořit reaktivní intermediát ferrylového typu, tj. porfyrinový radikál-kation v komplexu s $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, také nazývaný sloučenina I [110].

Cytochromy P450 (CYP) tvoří širokou skupinu enzymů zapojených mimo jiné do první fáze biotransformace xenobiotik. Katalyzují zejména hydroxylace lipofilních substrátů za vzniku polárnějších, snadněji vylučitelných forem [68]. Většina CYP je integrována v membráně endoplasmatického retikula (ER) a mitochondrií [111]. V lidském genomu je kódováno 57 genů pro CYP, z nichž se mnohé vyskytují v několika isoformách vykazujících značný polymorfismus, způsobující interindividuální rozdíly v metabolismu xenobiotik [112]. Další charakteristickou vlastností je indukovatelnost exprese genů pro CYP samotnými xenobiotiky, přičemž schopnost transkripční aktivace CYP byla prokázána i v případě hemu [113]. Pro monooxygenasové reakce zprostředkované CYP je nezbytný dvouelektronový donor, jehož roli plní obvykle

nikotinamidadenindinukleotidové koenzymy. Samotná hydroxylace je založena na tvorbě reaktivní sloučeniny I, která snadno podléhá ataku nukleofilním substrátem [114].

Cytochrom *c* oxidasa katalyzuje redukci molekuly kyslíku v poslední fázi dýchacího řetězce na vnitřní mitochondriální membráně podle rovnice (13). Během reakce dochází k přenosu čtyř elektronů z redukovaného cytochromu *c* na molekulu kyslíku [68]. Příjem elektronů zajišťuje vazebné místo tvořené dvěma kationty měďnatými. Elektrony jsou pak prostřednictvím hemu *a* přeneseny do katalytického centra enzymu, složeného z iontu měďnatého a hemu *a*₃ (Fe^{III}), kde probíhá samotná redukce kyslíku [115].



Peroxidasy rovněž katalyzují oxidaci řady substrátů podle rovnice (14), katalasy zajišťují rozklad peroxidu vodíku podle rovnice (15). Pro redukci molekuly peroxidu vodíku jsou potřebné dva elektrony – jeden z nich je poskytnut hemovým kationtem železnatým (který je oxidován na sloučeninu I) a druhý pochází z oxidovaného organického substrátu (v případě peroxidasy), resp. z druhé molekuly peroxidu vodíku (v případě katalasy) [68]. Význam těchto enzymů v ochraně proti oxidativnímu stresu byl naznačen v oddílu 1.3 (s. 12).



2.3.3 Hemoproteiny zajišťující přenos elektronu

Zástupci této skupiny hemoproteinů byly objeveny jako transportéry elektronů v dýchacím řetězci na vnitřní mitochondriální membráně a po spektroskopické charakterizaci byly Keilinem označeny jako cytochromy *a*, *b*, *c*, podle typu vázaného hemu [116]. Cytochromy se vedle mitochondrií uplatňují také v ER a v případě rostlin i v chloroplastech [68]. Pro tuto skupinu hemoproteinů je charakteristický přechod mezi oxidačními čísly železa +II a +III beze změny spinového stavu (ionty zůstávají v nízkospinovém uspořádání), díky čemuž je elektronový přenos usnadněn [68].

Nejvýznamnějším a nejlépe charakterizovaným zástupcem je cytochrom *c*, který slouží jako přenašeč elektronu mezi komplexem III (ubichinol–cytochrom *c* reduktasa nebo alternativně komplex *bc*₁, který je tvořen cytochromem *b*, Rieskeho Fe–S proteinem a cytochromem *c*₁ [117]) a komplexem IV (cytochrom *c* oxidasa) v dýchacím řetězci [68].

2.3.4 Hemové sensorové proteiny

Rozsáhlou skupinou hemoproteinů jsou proteiny propůjčující hemu roli signálu, široce zastoupené v prokaryotických i eukaryotických organismech. Prostorové uspořádání hemových sensorových proteinů je vysoce variabilní a flexibilní, přičemž se objevují motivy jak s pentakoordinovaným, tak hexakoordinovaným iontem železa hemu.

První podskupinou hemových sensorů jsou senzory plynu, tj. proteiny, v jejichž sensorové doméně je molekula hemu vázána trvale a je schopna reverzibilně vázat molekuly plynu (kyslíku, oxidu uhelnatého, popř. oxidu dusnatého). Hemoprotein v tomto případě typicky deteguje hladinu příslušného plynu v intracelulárním prostředí, na základě čehož přenáší signál do své funkční domény [118]. Analogicky jako v případě Hb a Mb bývá ion železa hemu pentakoordinován pomocí proximálního histidinu.

Druhou podskupinou jsou senzory hemu, v nichž se hem jako signální molekula reverzibilně váže v sensorové doméně apoproteinu, a tím řídí aktivitu jeho funkční domény [119]. Prostřednictvím těchto proteinů se hem zapojuje do řady intracelulárních procesů – regulace transkripce a translace, sestřih mikro RNA, koordinace metabolismu (např. aktivita proteinkinas, degradace proteinů, metabolismus samotného hemu) a iontových kanálů, popř. i řízení cirkadiánních rytmtů [120]. Tyto proteiny mohou také sloužit jako redoxní senzory, protože struktura vznikajícího komplexu apoprotein–hem je výrazně závislá na oxidačním stavu koordinovaného iontu železa hemu [119].

Pro senzory hemu je typická přítomnost tzv. cystein–prolinového motivu (CP motiv), který zajišťuje koordinaci hemu prostřednictvím thiolátové skupiny cysteinového zbytku, přičemž prolin tento proces stéricky reguluje [119]. Vazbu na hem může v jiných případech zajišťovat samotný cystein, popř. histidin a další aminokyseliny [121].

Příkladem sensorů hemu je hemem regulovaný inhibitor (HRI), který je schopen po disociaci hemu z jeho sensorové domény inhibovat syntézu globinu fosforylací iniciačního faktoru. A naopak, kinasová aktivita funkční domény tohoto proteinu je inhibována interakcí sensorové domény s hemem (odtud je odvozen název). Tomuto proteinu je věnován další oddíl.

3 Hemem regulovaný inhibitor

Rychlým a efektivním mechanismem, kterým mohou buňky reagovat na změny podmínek, je regulace genové exprese na úrovni translační iniciace, jakožto rychlost určujícího kroku translace mRNA. Nejlépe popsáním příkladem uplatnění tohoto mechanismu je inhibice eukaryotického iniciačního faktoru 2 fosforylací jeho α -podjednotky (eIF2 α). V savčích buňkách je tato reakce katalyzována čtveřicí kinas, z nichž každá zprostředkovává odezvu na různé stresové podmínky [122]. V této kapitole je nejprve věnována pozornost podrobnější charakterizaci jedné z nich – HRI, poté je stručně pojednáno o dalších kinasach a o společném mechanismu inhibice iniciace translace.

3.1 Charakterizace hemem regulovaného inhibitoru

HRI, nebo alternativně eIF2 α kinasa 1 (EIF2AK1, EC 2.7.11.1), patří mezi hemové senzorové proteiny, jeho enzymová aktivita je tedy bezprostředně regulována koncentrací hemu v cytosolu [123]. Ačkoli je ponejvíce exprimován v retikulocytech, v nichž inhibuje syntézu globinu při nedostatku hemu [124], nachází se ve značných koncentracích také v játrech a ve slezině; v nižších koncentracích pak v mozku, ledvinách, plicích, brzlíku, žaludku, slinivce, varlatech a v tlustém střevě [125, 126].

Počáteční studie ukázaly, že kinasová aktivita HRI zahrnuje nejen fosforylací eIF2 α (intermolekulární), ale také intramolekulární autofosforylací, která podmiňuje rozpustnost HRI tím, že brání agregaci jeho molekul [123]. Potvrdilo se, že obě fosforylační reakce jsou inhibovány hemem [127], nicméně mechanismus těchto reakcí a jejich regulace byly předmětem spekulací.

Bauer et al. uvedli [127], že molekula HRI je schopna vázat dvě molekuly hemu, přičemž jedno vazebné místo je saturováno pevně vázaným hemem a druhé vazebné místo je schopno vázat hem reverzibilně, a tedy též zprostředkovávat regulaci aktivity HRI. Struktura HRI je tvořena pěti doménami – N-koncovou doménou, centrální kinasovou insertní (KI) doménou obklopenou dvěma dalšími kinasovými doménami (označovanými kinasa I a kinasa II) a doménou C-koncovou. Podle Rafie-Kolpina et al. [128] se jedna molekula hemu váže na N-koncovou doménu a druhá molekula na KI doménu, přičemž vazba na N-koncovou doménu je nezbytná pro stabilní navázání hemu a zároveň pro dosažení vyšší afinity k eIF2 α . Později se však ukázalo [129], že hem se na HRI váže v poměru 1 : 1, přičemž ion železa hemu je koordinován histidinovým zbytkem N-koncové domény a cysteinovým zbytkem KI domény. Tento cysteinový zbytek je součástí jednoho ze dvou CP motivů přítomných v HRI [130].

Chenová ve svém přehledovém článku dále shrnula [131], že regulace aktivity HRI koncentrací hemu v cytosolu je založena na vícekrokové autofosforylaci. V první fázi jsou autofosforylovány nově syntetizované molekuly HRI, díky čemuž je zabráněno jejich agregaci (HRI má v této fázi pouze autokinasovou aktivitu, není tedy schopen fosforylovat eIF2 α). Autofosforylace ve druhém kroku umožní vznik stabilního oligomeru, který už je regulován vazbou molekuly hemu. Při vysokých koncentracích hemu se molekula hemu naváže na tento oligomer, a způsobí tak inhibici jeho kinasové aktivity. Naopak při nedostatku hemu proběhne třetí fáze autofosforylace, při níž je fosforylován Thr485, který zajišťuje samotnou eIF2 α -kinasovou aktivitu. Takto plně aktivovaný HRI již není hemem regulován a dochází k jeho degradaci [132].

Dlouhou dobu přetrvával konsensus, že zmíněný oligomer HRI je dimerem [131], později se však ukázalo, že se jedná pravděpodobně o hexamer [129]. Pro stabilitu tohoto hexamerního stavu je zásadní N-koncová doména, neboť připravené mutantní proteiny se zkráceným N-koncem tvoří směs oligomerů, v níž převažují trimery [129]. Na druhou stranu kinetické experimenty se zkrácenými mutanty ukázaly, že přestože vazba hemu na N-koncovou zvyšuje kooperativitu podjednotek HRI, není katalytická aktivita HRI přítomností N-koncové domény podmíněna [129]. Aktivita kinasové domény dokonce odolává tepelnému šoku (nad 42 °C) a extrémnímu pH (3–10) [133]. N-koncová doména se pravděpodobně též podílí na rozpoznávání substrátu HRI, eIF2 α [129]. Celkem tedy shrňme, že N-koncová doména je nezbytná pro zachování oligomerního stavu HRI a pro zprostředkovávání vysoce citlivé regulace hemem. Afinita hemu vůči HRI je navíc mnohem nižší než např. vůči Hb a Mb, jak odpovídá senzorové funkci HRI [126].

Zvýšení kooperativity podjednotek HRI vůči eIF2 α je též indikováno sigmoidní závislostí počáteční rychlosti na koncentraci eIF2 α [129]. Sigmoidní závislost je pravděpodobně důležitým aspektem senzorové funkce proteinu – rychlá a účinná inhibice kinasové aktivity je vyvolána až vyššími koncentracemi hemu. Dodejme, že vůči druhému substrátu kinasové reakce, adenosintrifosfátu (ATP), se tato závislost řídí kinetikou Michaelise a Mentenové [129]. Interakce podjednotek hexameru tak ovlivňuje katalytický účinek pouze vůči eIF2 α , nikoliv vůči relativně menšímu substrátu ATP.

Inhibiční účinek na katalytickou aktivitu HRI mají rovněž produkty katabolismu hemu, např. biliverdin a bilirubin (viz oddíl 2.2.3, s. 25) [129]. Tedy zatímco nedostatek hemu HRI aktivuje, a způsobuje tak inhibici translační iniciace, mohou naopak produkty jeho katabolismu inhibovat HRI, a umožňovat tak průběh proteosyntézy. Lze tedy uvažovat, že z tohoto důvodu se HRI uplatňuje jako regulující hemový senzor nejen v retikulocytech, ale také v dalších tkáních, zmíněných výše [129].

3.2 Funkce hemem regulovaného inhibitoru

HRI je pravděpodobně nejvýznamnějším hemovým senzorem, který zprostředkovává integrovanou stresovou reakci v eukaryotických organismech. Prvotní studie se zaměřovaly na klíčovou roli HRI v retikulocytech – regulaci syntézy globinu v závislosti na aktuální koncentraci hemu. Udržení koncentrací hemu a globinových řetězců v poměru 1 : 1 je zásadním předpokladem přežití dozrávajícího retikulocyty, neboť nadbytečný hem i globin by pro něj byl toxický [131]. Toxicita volného hemu byla vysvětlena v oddílu 2.2 (s. 21); riziko přítomnosti volného globinu spočívá ve špatném složení jeho řetězců vedoucí k agregaci [134].

Po prokázání sekvenční homologie HRI izolovaného z králičích retikulocytů, krysího mozku a myších jater [125] byla exprese potvrzena také v dalších tkáních [126], jak bylo zmíněno v úvodu kapitoly. Ačkoli i neretikulocytární HRI vykazuje citlivost na koncentraci hemu [126], lze aktivaci HRI vyvolat i jinými efekty. Těmito efekty může být tepelný šok, osmotický stres nebo přítomnost aniontu arsenitanového [135].

Ukázán byl také protektivní účinek HRI vůči stresu ER. Efekt byl prokázán nejprve knockoutem HRI v myších hepatocytech [136], později bylo objeveno zvýšení hepatické exprese fibroblastového růstového faktoru 21, proteinu důležitého pro zmírnění stresu ER [137]. Delece HRI na myších modelech rovněž vedla k omezení exprese hepcidinu v játrech a k poškození zrání makrofágů [138]. V nervových buňkách HRI reguluje translaci ϵ_2 podjednotky glutamátového receptoru [139].

Dále bylo zjištěno, že v nádorových buňkách je výrazněji indukována exprese eIF2 α ve srovnání se zdravými buňkami, jak odpovídá vyšší translační aktivitě těchto buněk [32, 36, 37]. V brzkých stádiích rakoviny dochází v nádorových buňkách ke zvýšení kinasové aktivity HRI, a tím ke zlepšení stavu [140]. Nicméně tento tumor supresorový účinek fosforylace eIF2 α a inhibice translace je později překonán adaptivními mechanismy, kterými buňky reagují na stres ER, a které jsou zároveň příznivé pro další růst nádoru [141].

Zatímco vůči chronickému stresu ER se nádorové buňky přizpůsobují zmíněnými nežádoucími adaptivními mechanismy, farmakologická aktivace fosforylace eIF2 α (prostřednictvím HRI, popř. dalších kinas uvedených v následujícím oddílu) tyto adaptivní mechanismy nevyvolává. Díky tomu lze pomocí farmakologické aktivace kinas přímo a trvale inhibovat iniciační translaci, a vyvolat tak buněčnou smrt [142]. Nádorové buňky mohou být na tuto trvalou aktivaci fosforylace eIF2 α velmi náchylné, jak bylo

ukázáno omezením růstu linií nádorových buněk *in vitro* i omezením růstu nádorů *in vivo* [143, 144].

3.3 Eukaryotický iniciační faktor 2 a jeho fosforylace

Věnujme nyní pozornost substrátu kinasové reakce HRI, eIF2 α . Protein eIF2 je tvořen třemi podjednotkami – α , β , γ , přičemž v uvedeném pořadí roste jejich molekulová hmotnost. O mimořádné důležitosti tohoto proteinu svědčí jeho vysoce konzervovaná primární struktura napříč řadou druhů [145]. Zmiňovaná regulační kinasová reakce probíhá na Ser51 α -podjednotky. β -podjednotka obsahuje několik dalších center pro fosforylaci. Mimoto součástí C-koncové domény eIF2 β je vazebné místo pro faktor pro výměnu guaninových nukleotidů eIF2B. γ -podjednotka obsahuje tři vazebná místa pro guanosindifosfát (GDP) a rovněž vazebné místo pro transferovou RNA (tRNA) nesoucí methioninový zbytek (Met–tRNA_i^{Met}) [145]. Hlavní úlohou eIF2 je zajištění transportu Met–tRNA_i^{Met} na ribosom. Popišme nyní proces eukaryotické translační iniciace podrobněji.

Prvním krokem iniciační translace je vazba mRNA, již přítomné v cytosolu, na komplex eIF4F prostřednictvím tzv. 5' čepičky (7-methylguanosin navázaný na první nukleotid mRNA, tento strukturní element v eukaryotických organismech označuje transkripty určené k translaci [122]). V druhém kroku dochází ke vzniku preiniciačního komplexu navázáním malé ribosomální podjednotky na ternární komplex tvořený eIF2, guanosintrifosfátem (GTP) a Met–tRNA_i^{Met}. Preiniciační komplex se posouvá po mRNA ve směru od 5' k 3', až dosáhne iniciačního kodonu AUG. Kodon AUG se následně páruje s antikodonem na Met–tRNA_i^{Met} za hydrolýzy GTP a následného uvolnění neaktivního komplexu eIF2–GDP. Konečně dojde ke spojení malé a velké ribosomální podjednotky za vzniku elongačně aktivního ribosomu, na němž může pokračovat syntéza polypeptidového řetězce [146, 147].

Regeneraci eIF2–GTP z uvolněného komplexu eIF2–GDP zajišťuje faktor pro výměnu guaninových nukleotidů eIF2B [148]. eIF2 fosforylovaný na své α -podjednotce (eIF2 α –P) má však k eIF2B vyšší afinitu než nefosforylovaný eIF2. Protože intracelulární koncentrace eIF2B je mnohem nižší než eIF2, dokáže i poměrně malé množství eIF2 α –P zcela inhibovat aktivitu eIF2B [149]. Důsledkem této inhibice je rychlý pokles koncentrace eIF2–GTP, a tím snížení celkové rychlosti translace. [149]

Vedle inhibice translace je dalším možným důsledkem fosforylace eIF2 α selektivní podpora translace některých transkripčních faktorů. Nejlépe popsána je indukce exprese aktivačního transkripčního faktoru 4 [150]. Mezi další transkripční faktory, jejichž

exprese je indukována fosforylací eIF2 α , je rodina nukleárních faktorů κ B, protein p53 a homologní CCAAT-vazebný protein [151].

Nyní se zaměříme na onu rodinu savčích kinas eIF2, které společně zajišťují integrovanou stresovou reakci, tj. buněčnou odpověď na stresové podmínky vnitřního či vnějšího prostředí. Mezi vnější faktory patří hypoxie, nedostatek glukosy a aminokyselin, virová infekce a přítomnost reaktivních forem kyslíku. Hlavním vnitřním faktorem je stres ER vyvolaný akumulací nesložených proteinů [152]. Vedle HRI patří do této enzymové rodiny proteinkinasa závislá na dvouvláknové RNA (PKR, z angl. *protein kinase double-stranded RNA-dependent*), ER kinasa podobná PKR (PERK, z angl. *PKR-like ER kinase*) a nederepresibilní hlavní kontrolní kinasa (GCN2, z angl. *general control nederepressible kinase*).

PKR je klíčovým proteinem pro zajištění buněčné odezvy na virovou infekci. Charakteristickým rysem proteinu je přítomnost dvou vazebných míst pro dvouvláknovou RNA v N-koncové doméně. Transkripce PKR je indukována interferony secernovanými v časných stádiích virové infekce [153]. Nativní forma PKR je neaktivní, přičemž k aktivaci dochází dimerizací a následnou autofosforylací. Tato aktivace je vyvolána navázáním dvouvláknové RNA vznikající virovou replikací. Mimoto může být PKR aktivována proteiny tepelného šoku, růstovými faktory a heparinem [154].

PERK je transmembránový protein ER, jehož N-koncová doména leží uvnitř lumina ER, zatímco C-koncová doména nesoucí kinasovou aktivitu je lokalizována v cytosolu [155]. N-koncová doména zprostředkovává dimerizaci a regulaci aktivity PERK, jakož i jeho asociaci s potřebnými chaperony. V neaktivním stavu PERK interaguje s imunoglobulin-vážícím proteinem. Akumulace špatně složených proteinů v ER vyvolá disociaci PERK od imunoglobulin-vážícího proteinu. PERK následně podléhá dimerizaci a autofosforylaci, které podmiňují jeho kinasovou aktivitu, analogicky jako v případě PRK [156]. Primární funkcí PERK je tedy zajistit prostřednictvím inhibice proteosyntézy čas potřebný ke správnému složení proteinů a k degradaci špatně složených proteinů [151]. Ukazuje se však, že aktivace PERK je možná i v nepřítomnosti špatně složených proteinů – na regulaci jeho aktivity se též podílejí změny koncentrací vápenatých iontů a ATP v ER [157].

GCN2 působí primárně jako senzor dostupnosti aminokyselin. Při nedostatku esenciálních aminokyselin nebo při inhibici syntézy neesenciálních aminokyselin dochází k akumulaci nenabitých tRNA. Součástí struktury GCN2 je doména příbuzná histidyl-tRNA-synthetase, která má vůči nenabitým tRNA vyšší afinitu než vůči nabitým [158].

Vazbou nenabitých tRNA na tuto doménu dochází k aktivaci GCN2 prostřednictvím dimerizace a autofosforylace [159]. Nedávno se však ukázalo, že aktivace GCN2 je možná též působením virové infekce a ultrafialového záření [151].

4 Cíle bakalářské práce

Pro předkládanou bakalářskou práci byly stanoveny následující cíle:

- Prvním cílem této bakalářské práce bylo provedení literární rešerše zaměřené na poznatky o hemových sensorových proteinech, se zvláštním zřetelem na protein HRI. Pozornost byla věnována také proteinu eIF2 α , substrátu proteinu HRI.
- Druhým cílem byla amplifikace plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α a ověření jeho autenticity pro expresi eukaryotického proteinu eIF2 α v buňkách *E. coli* BL-21(DE3).
- Dalším cílem byla transformace buněk *E. coli* BL-21(DE3) plasmidem pET-21c(+)/eIF2 α , resp. pET-21c(+)/HRI a exprese proteinu eIF2 α , resp. HRI, v těchto transformovaných buňkách.
- Stěžejním záměrem byla izolace a následná purifikace exprimovaného proteinu eIF2 α , resp. HRI, z buněk *E. coli* BL-21(DE3). Navazujícím cílem bylo srovnání úspěšnosti rekombinantní exprese proteinu eIF2 α a HRI z hlediska jejich výtěžků a čistoty.
- Dalším cílem bylo ověření enzymové aktivity izolovaného proteinu HRI a ověření schopnosti tohoto proteinu interagovat s hemem.
- V neposlední řadě bylo cílem práce studium schopnosti jiných nukleosidtrifosfátů (GTP, UTP, CTP) sloužit jako zdroje fosfátu pro fosforylaci proteinu eIF2 α katalyzovanou proteinem HRI. Souvisejícím cílem bylo zjistit, zda fosforylace proteinu eIF2 α může probíhat i působením fosfoenolpyruvátu jako donoru fosfátu bez katalýzy enzymem HRI.

5 Materiál a metody

5.1 Použité chemikálie

BD Biosciences, USA	Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract
Bio-Rad, USA	peroxodisíran amonný Precision Plus Protein™ Unstained Standards
BioTool, Švýcarsko	Quick-Fusion Cloning Kit
California Corporation for Biochemical Research, USA	tetrasodná sůl cytidin-5'-trifosfátu (CTP), trisodná sůl fosfoenolpyruvátu
Clontech, USA	TALON® Metal Affinity Resin
Fluka, Švýcarsko	akrylamid, dodecylsírán sodný (SDS, z angl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), lysosym, 2-merkapt ethanol, <i>N,N'</i> -methylen-bis(akrylamid), tris(hydroxymethyl)aminoethan (Tris)
Invitrogen, USA	SYBR SAFE™ DNA Gel Stain
Lach-Ner, ČR	bromfenolová modř, dihydrogenfosforečnan draselný, dithioničitan sodný, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), glycerol, hemin, hydrogenfosforečnan sodný, chlorid hořečnatý, chlorid draselný, chlorid manganatý, chlorid sodný, imidazol
Linde, ČR	oxid uhelnatý
New England BioLabs, USA	2-log DNA Ladder, CutSmart pufr, Gel Loading Dye, Monarch® DNA Gel Extraction Kit, Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, pufr Phusion® High-Fidelity, <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>
Pharmacia, Švýcarsko	agarosa
QIAGEN, Německo	QIAprep Spin Miniprep Kit
SERVA Electrophoresis, Německo	ampicilin, disodná sůl adenosin-5'-trifosfátu (ATP), <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin (TEMED)
Sigma, USA	trisodná sůl uridin-5'-trifosfátu (UTP), disodná sůl guanidin-5'-trifosfátu (GTP)

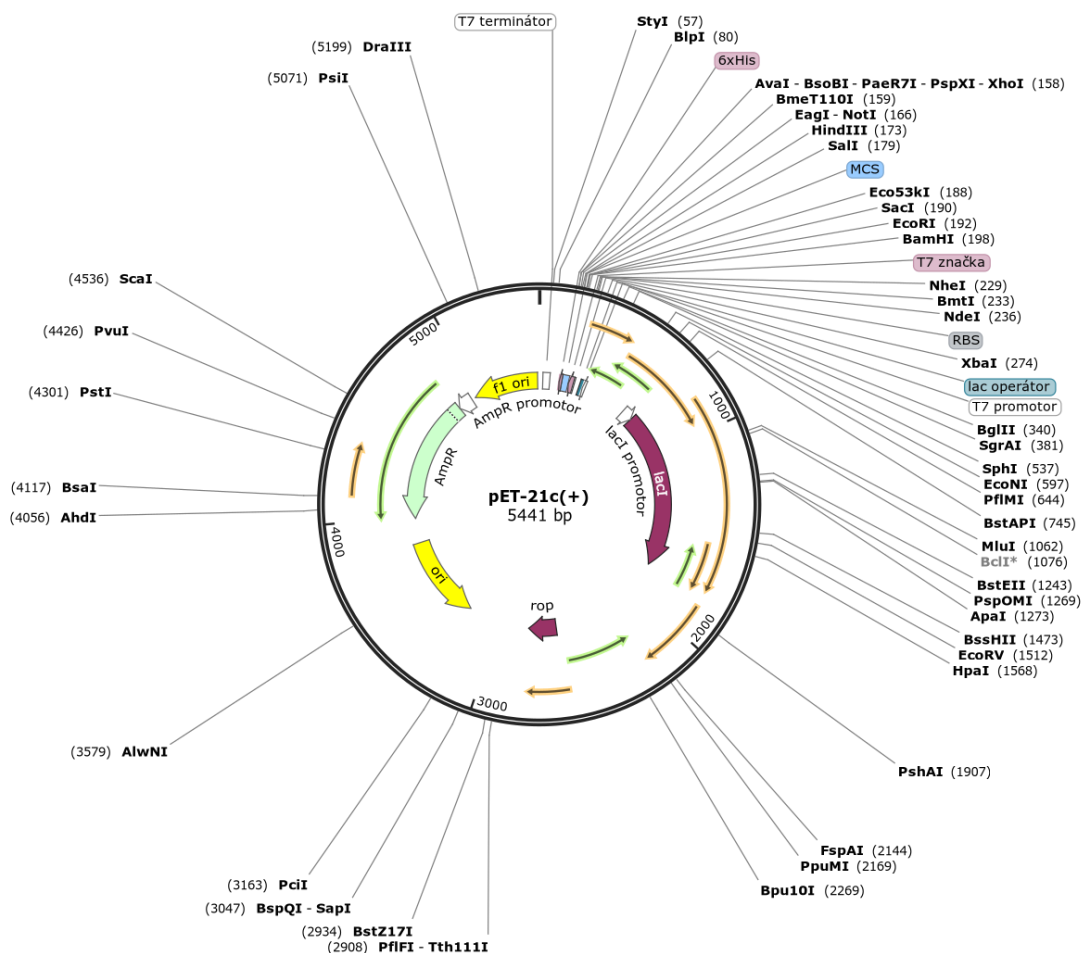
Sigma-Aldrich, USA	cOmplete™ ULTRA Tablets, isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), InstantBlue™ Protein Stain, Luria-Bertani (LB) agar, Luria-Bertani Broth
Stratagen, USA	bakteriální kmeny <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5α a <i>E. coli</i> BL-21(DE3)
Wako Pure Chemical Industries, Japonsko	Phos-tag (1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olát manganatý)

Složení LB agaru	2,5 % (w/v) Luria-Bertani Agar
Složení LB média	4 % (w/v) Luria-Bertani Broth
Složení TB média	1,2 % (w/v) Bacto Tryptone, 2,4 % (w/v) Bacto Yeast Extract, 0,2 % (w/v) hydrogenfosforečnan draselný, 1,3 % (w/v) dihydrogenfosforečnan draselný, 0,4 % (v/v) glycerol

Připravený LB agar, LB médium i TB médium byly sterilizovány po dobu 4 h při 120 °C. Další chemikálie (IPTG, ampicilin) byly sterilizovány přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm.

Plasmid pET-21c(+)

Plasmid pET-21c(+) (5 441 párů bází) použitý pro expresi proteinů eIF2α a HRI v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) byl laskavě poskytnut spolupracující laboratoří prof. Toru Shimizu (Sendai, Japonsko). Tento plasmid nese T7 promotor specifický pouze pro T7 RNA polymerasu, která je výkonnější než RNA polymerasa bakterii *E. coli* vlastní (gen pro T7 polymerasu byl integrován pomocí genomu bakteriofága). Gen umístěný za T7 promotorem (sekvence pro eIF2α, resp. HRI) je exprimován s vysokou efektivitou. Plasmid rovněž nese gen zajišťující rezistenci k ampicilinu, díky čemuž je umožněna selekce buněk transformovaných tímto plasmidem. Na přítomný *lac* operátor se váže *lac* represorový protein, který inhibuje transkripci – tuto inhibici může potlačit přidavek laktosy nebo IPTG. Dále je součástí plasmidu sekvence pro N-koncovou T7 značku a tzv. C-koncovou histidinovou kotvu. Mapa plasmidu je znázorněna na Obrázku 3, s. 39).



Obrázek 3: Mapa plasmidu pET-21c(+) (převzato z [160] a přeloženo), vizualizováno pomocí softwaru SnapGene® 5.1.3.1. Zelená šipka (AmpR) označuje sekvenci zajišťující resistenci k ampicilinu. Na pozici 158 se nachází restrikční místo pro endonukleasu *XhoI*, na pozici 236 restrikční místo pro endonukleasu *NdeI*. V mapě je dále znázorněna mj. sekvence pro histidinovou kotvu, T7 promotor a *lac* operátor.

5.2 Použité přístroje

Analytické váhy	ER-120A, A&D Instruments LTD
Autokláv	Panasonic MLS-37812
Bezdotykový kahan	Gasprofi2 SCS, VLD-TEC
Centrifuga	5415 R, Eppendorf Gilson, GmC Lab Janetzki K70D, MLW Z383K, HERMLE
Elektroforetická aparatura	MultiSUB Mini, Cleaver Scientific Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad
Stanice pro gelovou permeační chromatografii	ÄKTAprime plus™, GE Healthcare
Inkubátor	Economy Incubator Size 1, Gallenkamp Mini Rocker Mr-1, BioSan
Kolona pro gelovou permeační chromatografii	Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare
Laminární box	BIO 126, Labox
Magnetická míchačka	KMO2 basic, IKA
Orbitální třepačka	Incubator Shaker, BT Lab Systems Multitron Pro, INFORS HT Multitron Standard, INFORS HT Shaker SHO, Witeg
Předvážky	440-35N, KERN
Spektrofotometr	DS-11 Spectrophotometer, DeNovix Cary 60 UV-Vis, Agilent
Suchá lázeň	Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science
Transiluminátor	Dark Reader, Clare Chemical Research
Ultracentrifuga	Optima™ LE-80K, Beckman Coulter
Ultrazvukový homogenizátor	Sonoplus HD 3100, sonda KE 76, Bandelin
Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu	PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad

5.3 Použité metody

5.3.1 Příprava agarových ploten

Pro kultivaci buněk kompetentních k expresi proteinu a amplifikaci plasmidu byly v této práci využity agarové plotny s obsahem ampicilinu připravené následujícím způsobem. Předem připravený sterilní LB agar byl rozpuštěn ohřevem v mikrovlnné troubě při středním výkonu za průběžného míchání po dobu asi 10 minut. Rozpuštěný agar byl ponechán samovolně ochladit na laboratorní teplotu a poté byl přesunut do laminárního boxu (BIO 126, Labox), v němž byly prováděny všechny následující kroky. Do 50ml sterilní zkumavky (Falcon) bylo převedeno 20 ml LB agaru. Po přidavku 20 μ l předem připraveného zásobního roztoku ampicilinu (100 mg ml^{-1}) pomocí automatické pipety byla směs jemně promíchána.

Na 2 Petriho misky bylo aplikováno po 10 ml připravené směsi pomocí automatické pipety. Směs byla rozprostřena krouživým pohybem po celé ploše Petriho misky a ponechána v laminárním boxu po dobu 30 minut. Tímto způsobem byly připraveny 2 plotny pro další přípravné kroky v konečné fázi vedoucí k expresi proteinu eIF2 α . Stejný postup byl uplatněn pro přípravu 2 ploten pro přípravné kroky v konečné fázi vedoucí k expresi proteinu HRI a 2 ploten využitých v procesu amplifikace plasmidové deoxyribové kyseliny (DNA) nesoucí gen pro eIF2 α .

5.3.2 Transformace buněk *E. coli* BL-21(DE3), resp. *E. coli* DH5 α , a příprava jejich jednobuněčných kolonií

Kompetentní buňky *E. coli* BL-21(DE3) (Stratagen, USA) byly ponechány inkubovat v ledové lázni. Po inkubaci byly buňky přesunuty do laminárního boxu (BIO 126, Labox), v němž byly prováděny všechny následující kroky. Do dvou sterilních mikrozkuvek bylo převedeno po 25 μ l suspenze kompetentních buněk pomocí automatické pipety. Do jedné mikrozkuvky bylo přidáno 0,5 μ l plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α . Druhá mikrozkuvka obsahující pouze suspenzi buněk byla využita jako negativní kontrola. Buňky v mikrozkuvkách byly následně inkubovány po dobu 10 minut na ledu, poté byly přemístěny zpět do laminárního boxu.

Předem připravené LB médium bylo ponecháno inkubovat na laboratorní teplotu a následně převedeno do 50ml sterilní zkumavky (Falcon). Do obou mikrozkuvek s buňkami bylo aplikováno 175 μ l LB média pomocí automatické pipety. Po promíchání byl obsah každé z mikrozkuvek pomocí automatické pipety převeden na agarovou plotnu obsahující ampicilin (viz oddíl 5.3.1). Směs byla rozestřena rovnoměrně

po celém povrchu plotny pomocí sterilní zahnuté skleněné tyčinky. Agarové plotny s aplikovanou buněčnou suspenzí byly opatřeny víčkem a uzavřeny parafilmem. Následně byly umístěny dnem vzhůru do inkubátoru (Economy Incubator Size 1, Gallenkamp), kde byly inkubovány po dobu 16 hodin při 37 °C. Po inkubaci byly vloženy do lednice, kde byly připraveny k dalšímu použití.

Kolonii transformovaných buněk bylo pro další postup třeba „přeočkovat“ z agarové plotny do tekutého LB média. Po skončení inkubace byly vybrány 2 průměrně velké kolonie transformovaných buněk na agarové plotně. V laminárním boxu bylo do dvou 50ml sterilních zkumavek (Falcon) převedeno pomocí automatické pipety po 5 ml LB média a 5 μ l zásobního roztoku ampicilinu (100 mg ml⁻¹). Zvolené bakteriální kolonie byly přeneseny do zkumavek pomocí sterilních dřevěných tyčinek. Zkumavky byly uzavřeny a následně byly předloženy k inkubaci po dobu 16 hodin při 37 °C a 200 RPM na orbitální třepačce (Incubator Shaker, BT Lab Systems). Dalším postupem bylo přenesení buněčné suspenze do TB média pro následnou expresi proteinu eIF2 α (viz oddíl 5.3.3).

Postup popsáný v tomto oddílu byl uplatněn též s použitím plasmidu pET-21c(+)/HRI jako první krok procesu vedoucího k expresi proteinu HRI (viz oddíl 5.3.3). Stejný postup byl rovněž využit při amplifikaci plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α – v tomto případě však byly plasmidem transformovány buňky *E. coli* DH5 α a k „přeočkování“ z agarové plotny do LB média a následné kultivaci byla zvolena pouze 1 kolonie (viz oddíl 5.3.4, s. 43).

5.3.3 Exprese proteinu eIF2 α , resp. HRI

Bakterie transformované plasmidem pET-21c(+)/eIF2 α a „přeočkované“ do LB média (viz oddíl 5.3.2, s. 41) byly následně využity k expresi proteinu eIF2 α . Do 16 Erlenmayerových baněk s předem připraveným TB médiem (celkový objem 8 l) bylo asepticky pomocí automatické pipety přidáno po 0,5 ml zásobního roztoku ampicilinu (100 mg ml⁻¹) a 0,5 ml suspenze „přeočkovaných“ buněk po kultivaci při 37 °C (viz oddíl 5.3.2, s. 41). Obsah všech baněk byl inkubován při 37 °C a 150 RPM na dvou orbitálních třepáčkách (Multipron Pro, INFORS HT a Multitron Standard, INFORS HT). Inkubace buněk byla prováděna do dosažení optické hustoty suspenze přibližně 1. Měření optické hustoty bylo prováděno na přístroji DS-11 Spectrophotometer (DeNovix, metoda „OD600“). První vzorek suspenze buněk byl odebrán po 3,5 hodinách inkubace, postup odběru vzorku a měření optické hustoty byl poté opakován do dosažení hodnoty uvedené výše. Poté byla snížena teplota inkubace na 15 °C a baňky byly ponechány chladit po dobu 30 minut. Byl odebrán vzorek k analýze pomocí SDS-elektroforézy a následně bylo do každé z 16 Erlenmayerových baněk přidáno po 0,1 ml

zásobního sterilního roztoku IPTG ($0,5 \text{ mol dm}^{-3}$), asepticky pomocí automatické pipety. Následně byly buňky předloženy zpět do orbitálních třepáček k inkubaci po dobu 16 hodin při 15°C a 120 RPM.

Po inkubaci byl odebrán vzorek k analýze SDS-elektroforézou. Expres proteinu eIF2 α byla následně ukončena centrifugací po dobu 45 minut při 4°C a 3 000 RPM (Janetzki K70D). Byla stanovena hmotnost získaných buněk (440-35N, KERN). Buňky byly uchovány v 50ml sterilních zkumavkách (Falcon) při -80°C pro další využití.

Popsaný postup exprese proteinu eIF2 α byl uplatněn také při expresi proteinu HRI v bakteriích transformovaných plasmidem pET-21c(+)/HRI.

5.3.4 Izolace plasmidové DNA nesoucí gen pro eIF2 α

Izolace amplifikovaného plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α z buněk *E. coli* DH5 α byla provedena pomocí komerčního kitu QIAprep SPIN Miniprep Kit. Kultivace jednobuněčných kolonií buněk *E. coli* DH5 α obsahujících plasmid pET-21c(+)/eIF2 α v 50ml sterilní zkumavce Falcon při 37°C (viz oddíl 5.3.2, s. 41) byla ukončena a její obsah byl předložen k centrifugaci po dobu 10 min při teplotě 4°C a 4 500 RPM (Z383K, HERMLE). Supernatant tvořený LB médiem byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v 250 μl pufru P1 obsahujícím RNAsu. Suspenze byla opatrně promíchána pomocí automatické pipety a asepticky převedena do sterilní mikrozkuavky (Eppendorf).

Do mikrozkuavky bylo přidáno 250 μl pufru P2 (obsahujícího hydroxid sodný a SDS), směs byla jemně šestkrát převrácena a ponechána inkubovat po dobu 5 minut. Poté bylo do směsi přidáno 350 μl pufru N3 (neutralizační pufr), mikrozkuavka byla desetkrát rychle převrácena a předložena k centrifugaci po dobu 10 minut při laboratorní teplotě a 13 200 RPM (5415 R, Eppendorf).

Supernatant obsahující DNA byl převeden do speciálních mikrozkuavek QIAprep Spin Column (součást použité soupravy, obsahují filtr s kladně nabitou maticí). Tato mikrozkuavka byla opět předložena k centrifugaci po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě a 13 200 RPM. Filtrát byl odstraněn a DNA zachycená na filtru zkumavky byla promyta 750 μl pufru PE. Byla opakována centrifugace za stejných podmínek jako v předchozích případech a po odstranění filtrátu byla zopakována ještě jednou. Filtr ze zkumavky byl převeden do čisté mikrozkuavky (Eppendorf) a těsně nad membránu bylo přidáno 50 μl pufru EB (eluční pufr). Směs byla ponechána inkubovat po dobu 1 minuty a centrifugována po dobu 1 minuty za stejných podmínek jako v předchozích případech. Po vyjmutí filtru bylo provedeno měření poměru absorbancí

při 260 a při 280 nm A_{260}/A_{280} a měření koncentrace DNA ve výsledném vzorku (DS-11 Spectrophotometer, DeNovix), viz oddíl 5.3.12 (s. 50). Získaný roztok DNA byl uchován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.5 Restrikční štěpení plasmidové DNA nesoucí gen pro eIF2 α

Vzorek amplifikovaného plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α izolovaného podle postupu popsáného v oddílu 5.3.4 byl podroben štěpení pomocí restrikčních endonukleas *Nde*I a *Xho*I. Do sterilní mikrozkušavky (Eppendorf) bylo převedeno pomocí automatické pipety 7 μl sterilní deionizované vody, 2 μl restrikčního pufru (CutSmart), 0,5 μl endonukleasy *Nde*I, 0,5 μl endonukleasy *Xho*I a 10 μl vzorku plasmidové DNA. Směs byla předložena k inkubaci po dobu 120 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Economy Incubator Size 1, Gallenkamp). Reakce byla zastavena přidávkem pufru pro agarosovou elektroforézu, pomocí níž byla směs následně analyzována (viz oddíl 5.3.6).

5.3.6 Horizontální elektroforéza na agarosovém gelu

Pro analýzu plasmidové DNA byla využita elektroforéza na 1% agarosovém gelu. Navážka 0,4 g agarosy (440-35N, KERN) byla převedena do 100ml Erlenmayerovy baňky a rozpuštěna ve 40 ml TAE pufru (40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 8,2). Směs byla vážena a zahřívána v mikrovlnné troubě za občasného promíchání do úplného rozpuštění agarosy. Do směsi byla přidána deionizovaná voda tak, aby směs dosáhla původní hmotnosti. Směs byla následně ochlazená proudem tekoucí vody a po přidávku 4 μl 10 000krát koncentrovaného barviva SYBRTM Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) byla promíchána a převedena do vany pro přípravu elektroforetického gelu. Do vany byl vložen hřeben pro vytvoření jamek. Směs ve vaně byla zakryta a ponechána stát po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byl vyjmut hřeben a vana s připraveným gelem byla přenesena do elektroforetické aparatury (multiSUB Mini, Cleaver Scientific) a aparatura byla naplněna TAE pufrem.

Ve sterilní mikrozkušavce (Eppendorf) byl připraven standard smísením 1 μl markeru 2-log DNA ladder (New England BioLabs), 1 μl šestkrát koncentrovaného barviva Gel Loading Dye (New England BioLabs) a 4 μl deionizované vody. V další mikrozkušavce bylo smíseno 4 μl šestkrát koncentrovaného barviva Gel Loading Dye (New England Biolabs) a 20 μl produktu po restrikčním štěpení plasmidové DNA. Standard a vzorek byly aplikovány do jamek gelu pomocí automatické pipety. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji napětí nastaveném na 110 V (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad). Elektroforéza probíhala 30 minut a poté byl agarosový gel přemístěn

na transiluminátor (Dark Reader, Clare Chemical Research) pro zviditelnění jednotlivých fragmentů DNA a výsledek byl zaznamenán.

5.3.7 Sekvenace plasmidové DNA nesoucí gen pro eIF2 α

Autenticita genu pro expresi proteinu eIF2 α v amplifikovaném plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α byla ověřena sekvenováním. Ve dvou tenkostěnných zkumavkách byly připraveny vzorky smísením po 5 μ l amplifikovaného plasmidu a 2 μ l vody (jeden vzorek pro sekvenování v dopředném a druhý ve zpětném směru). Připravené vzorky byly předány Laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

5.3.8 Izolace proteinu eIF2 α , resp. HRI

Protein eIF2 α byl izolován z celkového množství buněk, které byly uchovány po dvou realizacích exprese proteinu (viz oddíl 5.3.3, s. 42) při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 50ml sterilních zkumavkách (Falcon). Oba podíly buněk byly ponechány inkubovat po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Následně byl do zkumavek s buňkami přidán předem připravený resuspendační pufr (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM PMSF, 0,2 mg ml⁻¹ lysosym), do nějž byly přidány inhibitory proteas (cOmplete™ ULTRA Tablets), přičemž na 1 g buněk bylo použito 5 ml resuspendačního pufru.

Buněčná suspenze o celkovém objemu přibližně 450 ml byla rozdělena do dvou kádinek a za účelem porušení buněčných membrán byla podrobena ultrazvukové sonikaci (Sonoplus HD 3100, sonda KE 76, Bandelin). Sonikace probíhala šestkrát po dobu 1 minuty při amplitudě 55 %, přičemž mezi jednotlivými sonikacemi byla prováděna 1minutová pauza. Proces byl prováděn za stálého chlazení ledem a míchání na magnetické míchačce. Obsah kádinek byl následně rozdělen do celkem šesti centrifugačních kyvet, které byly předloženy k ultracentrifugaci po dobu 1 hodiny při teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 45 000 RPM (Beckman Optima™ LE-80 K, rotor 45Ti). Z jednoho ze získaných supernatantů byl odebrán vzorek pro analýzu SDS-elektroforézou.

Následujícím krokem byla purifikace proteinu pomocí afinitní chromatografie. Do dvou 15ml sterilních zkumavek (Falcon) bylo převedeno po 3 ml afinitního nosiče (TALON® Metal Affinity Resin) a zkumavky byly předloženy k centrifugaci po dobu 2 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 750 RPM (Z383K, HERMLE). Po odstranění supernatantu bylo do zkumavky přidáno 5 ml ekvilibračního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl) a po jemném promíchání byla směs znovu předložena k centrifugaci. Tento postup byl poté dvakrát zopakován, pokaždé s novým podílem 5 ml ekvilibračního pufru. Po poslední centrifugaci byl supernatant ponechán a obsah zkumavky byl jemně promíchán do vzniku homogenní suspenze.

Jednotlivé supernatanty získané při ultracentrifugaci suspenze buněk byly převedeny do čtyř plastových lahví a do každé z nich bylo přidáno stejné množství ekvilibrovaného afinitního nosiče. Láhve byly uzavřeny parafilemem a inkubovány po dobu 1 hodiny při 4 °C za pravidelného míchání. Během inkubace byly chromatografické kolony s fritami promyty 100 ml deionizované vody. Obsahy plastových lahví byly po skončení inkubace převedeny na jednotlivé kolony. Kolony byly promyty 50 ml ekvilibračního pufru a následně 15 ml elučního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 200 mM imidazol). Eluáty byly zachyceny do 15ml sterilních zkumavek (Falcon). Z jednoho eluátu byl také odebrán vzorek pro analýzu SDS-elektroforézou.

Získané eluáty byly přeneseny do zkumavek Millipore, jejichž součástí je membrána zadržující proteiny molární hmotnosti vyšší než 20 000 g mol⁻¹ (molární hmotnost eIF2α je přibližně 36 000 g mol⁻¹). Tyto zkumavky byly předem promyty ekvilibračním pufrem a následně podrobeny centrifugaci po dobu 15 minut při 4 °C a 3 000 RPM (Z383K, HERMLE). Objem spojených filtrátů byl redukován na 500 µl, opakovanou centrifugací vždy po dobu 2 minut při 4 °C a 3 000 RPM (Z383K, HERMLE).

Eluáty po afinitní chromatografii s redukováným objemem dle předchozího kroku byly dále podrobeny separaci pomocí gelové permeační chromatografii (ÄKTAprime™ plus, GE Healthcare) na koloně Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). Mobilní fází byl roztok obsahující 20 mM Tris-HCl a 150 mM NaCl. Dávkováno bylo 500 µl roztoku eluátu získaného po afinitní chromatografii s redukováným objemem. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml min⁻¹ a průběh chromatografie byl sledován pomocí spektrofotometrické detekce (absorbance při 280 nm). Zvolené frakce byly spojeny a převedeny do zkumavky Millipore (jejichž součástí je membrána zadržující proteiny molární hmotnosti vyšší než 20 000 g mol⁻¹) a předloženy k opakované centrifugaci na výsledný objem 240 µl, vždy po dobu 2 minut při 4 °C a 3 000 RPM (Z383K, HERMLE). Byla stanovena koncentrace proteinu eIF2α a byl odebrán vzorek pro analýzu SDS-elektroforézou. Produkt byl rozdělen do alikvotů o objemu 50 µl, které byly vystaveny kapalnému dusíku a následně uchovány při -80 °C.

Stejný postup byl aplikován pro izolaci proteinu HRI, opět z celkového množství buněk získaného při dvou expresích podle postupu uvedeného v oddílu 5.3.3 (s. 42). V případě HRI byl pro analýzu SDS-elektroforézou odebrán také eluát získaný při promytí kolony na afinitní chromatografii malým množstvím ekvilibračního pufru (teprve poté byla kolona promyta 50 ml ekvilibračního pufru a 15 ml elučního pufru). Pro redukci objemu eluátu v elučním pufre po afinitní chromatografii byly využity zkumavky Millipore s membránou zadržující proteiny molární hmotnosti vyšší než 30 000 g mol⁻¹ (molární

hmotnost HRI je přibližně $71\,000\text{ g mol}^{-1}$). Objem spojených frakcí odebraných ,při purifikaci gelovou permeační chromatografií byl v případě HRI redukován na 140 μl . Tento objem byl rozdělen do alikvotů o objemu 50 μl . Tyto alikvoty pak byly vystaveny kapalnému dusíku a uchovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.9 Studium vlivu donoru fosfátu na fosforylaci proteinu eIF2 α v přítomnosti nebo absenci proteinu HRI

Pro studium vlivu donoru fosfátu na fosforylaci eIF2 α byl nejprve připraven první zásobní roztok, který byl rozdělen do 5 alikvotů. Složení každého z alikvotů o objemu 10 μl bylo následující: 10,8 μM eIF2 α , 0,7 μM HRI, 27,8 mM Tris-HCl, pH 8,2, 2,8 mM chlorid hořečnatý a 83,5 mM chlorid draselný. Alikvoty byly preinkubovány při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Do prvních čtyř alikvotů byly přidány jednotlivé donory fosforu, tj. nukleosidtrifosfáty (ATP, GTP, UTP, CTP), vždy o výsledné koncentraci 1 mM. Do pátého alikvotu byla přidána pouze destilovaná voda.

Dále byl připraven druhý zásobní roztok o objemu 30 μl , který neobsahoval HRI. Jeho složení bylo následující: 10,8 μM eIF2 α , 31,3 mM Tris-HCl, pH 8,1, 3,1 mM chlorid hořečnatý a 94,0 mM chlorid draselný. Z tohoto druhého zásobního roztoku byl odebrán objem 10 μl , do něž byl přidán fosfoenolpyruvát o výsledné koncentraci 100 mM. K dalším experimentům byly tedy využity dva podíly tohoto druhého pracovního roztoku – první (10 μl) obsahující pouze protein eIF2 α a druhý obsahující protein eIF2 α a fosfoenolpyruvát (10 μl).

Všech sedm roztoků připravených v mikrozkušnicích (Eppendorf) bylo inkubováno při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 minut. Po skončení inkubace bylo do všech roztoků přidáno po 20 μl čtyřikrát koncentrovaného vzorkového pufru [0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) glycerol, 20 % (v/v) 2-merkaptoethanol, 0,004 % (w/v) bromfenolová modř]. Všechny odebrané vzorky byly analyzovány pomocí SDS-Phos-tag elektroforézy (za použití 10% separačního gelu obsahujícího Phos-tag a 0,2 mM chlorid manganatý) podle postupu popsání v oddílu 5.3.11 (s. 50).

5.3.10 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

Vzorky odebrané v průběhu exprese a izolace proteinu eIF2 α , resp. HRI, byly analyzovány pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-elektroforézou). Do sestavené elektroforetické aparatury (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) byla upevněna skla tloušťky 1 mm (odmaštěná ethanollem) pro přípravu 2 polyakrylamidových gelů. V kádince byla připravena směs

pro vznik 10% (w/v) separačního gelu smísením 6,7 ml pufru A [0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS], 3,3 ml polymerizačního roztoku A [30 % (w/v) akrylamid, 0,8 % (w/v) bis(akrylamid) v pufru A], 10 µl TEMED a 100 µl zásobního roztoku peroxodisíranu amonného (100 mg ml⁻¹). Směs v kádince byla rychle promísena a přenesena pomocí automatické pipety do prostoru mezi skly v elektroforetické aparatuře. Po převrstvení deionizovanou vodou byla směs ponechána inkubovat po dobu 30 minut do vzniku polyakrylamidového gelu, následně byla voda odstraněna.

V další kádince byla připravena směs pro vznik 4% (w/v) zaostřovacího gelu smísením 2,6 ml pufru B [0,125 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS], 400 µl polymerizačního roztoku B [30 % (w/v) akrylamid, 0,8 % (w/v) bis(akrylamid) v pufru B], 3 µl TEMED a 60 µl zásobního roztoku peroxodisíranu amonného (100 mg ml⁻¹). Směs v kádince byla rychle promísena a přenesena pomocí automatické pipety do prostoru mezi skly nad separační gel. Do aplikované směsi byl vložen hřeben pro vytvoření jamek a směs byla ponechána inkubovat do vzniku zaostřovacího gelu. Následně byla skla přemístěna do elektroforetické vany. Prostor mezi dvojicí skel a elektroforetická vana byly naplněny elektrodovým pufrům [25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 0,192 M glycin, 0,1 % (w/v) SDS].

Do mikrozkušavek byly připraveny vzorky pro analýzu vždy smísením se čtyřikrát koncentrovaným vzorkovým pufrům [0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) glycerol, 20 % (v/v) 2-merkptoethanol, 0,004 % (w/v) bromfenolová modř] a deionizovanou vodou. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v Tabulce 2 (eIF2α) a 3 (HRI) (viz s. 49). Všechny vzorky byly předloženy k inkubaci v suché lázni po dobu 5 minut při 100 °C (Mini Dry Bath, MD-MINI, Major Science) a následně krátce centrifugovány (Gilson, GmC Lab).

Po vyjmutí hřebenu ze zaostřovacího gelu byly do vytvořených jamek aplikovány vzorky (o objemech uvedených v Tabulkách č. 2 a 3) a standard (Precision Plus ProteinTM Standards) o objemu 8 µl. Po uzavření elektroforetické vany byl připojen zdroj elektrického napětí nastavený na 200 V (PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad). Elektroforéza probíhala 70 minut a po jejím skončení byly gely přemístěny do barvicí lázně (InstantBlueTM Protein Stain, Sigma Aldrich). Vyvíjení barvy probíhalo 1 hodinu, následně byly gely přemístěny do deionizované vody a ponechány inkubovat po dobu 16 hodin. Výsledky analýzy jednotlivých vzorků pomocí SDS-elektroforézy byly zaznamenány pro vyhodnocení.

Tabulka 2: Složení jednotlivých vzorků získaných během exprese a izolace proteinu eIF2 α pro analýzu SDS-elektroforézou. Uveden je odebraný objem vzorku, objem deionizované vody, objem čtyřikrát koncentrovaného vzorkového pufru a dále objem připraveného roztoku, který byl aplikován do jamek elektroforetického gelu.

vzorek	objem vzorku (μ l)	objem deionizované vody (μ l)	objem pufru (μ l)	objem aplikovaný na gel (μ l)
suspenze buněk před indukcí IPTG	10	20	10	10
suspenze buněk po indukcí IPTG	10	20	10	10
supernatant po ultracentrifugaci	10	20	10	10
eluát v elučním pufru po afinitní chromatografii	30	0	10	10
eluát v elučním pufru po afinitní chromatografii s redukováným objemem	30	0	10	15
zpracovaná frakce č. 10 z gelové permeační chromatografie	2	58	20	5
zpracované frakce č. 15–26 z gelové permeační chromatografie	2	58	20	5

Tabulka 3: Složení jednotlivých vzorků získaných během exprese a izolace proteinu HRI pro analýzu SDS-elektroforézou. Uveden je odebraný objem vzorku, objem deionizované vody, objem čtyřikrát koncentrovaného vzorkového pufru a dále objem připraveného roztoku, který byl aplikován do jamek elektroforetického gelu.

vzorek	objem vzorku (μ l)	objem deionizované vody (μ l)	objem pufru (μ l)	objem aplikovaný na gel (μ l)
suspenze buněk před indukcí IPTG	15	0	5	20
suspenze buněk po indukcí IPTG	15	0	5	20
supernatant po ultracentrifugaci	10	20	10	10
eluát v ekvilibračním pufru po afinitní chromatografii	10	20	10	10
eluát v elučním pufru po afinitní chromatografii	30	0	10	10
eluát v elučním pufru po afinitní chromatografii s redukováným objemem	5	10	5	5
zpracované frakce č. 13–19 z gelové permeační chromatografie	5	10	5	5
zpracované frakce č. 20–25 z gelové permeační chromatografie	5	10	5	5

5.3.11 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu obsahujícím Phos-tag v přítomnosti dodecylsírany sodného

Vzorky odebrané z inkubačních směsí během kinetických experimentů (viz oddíl 5.3.9, s. 47) byly analyzovány pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu obsahujícím Phos-tag v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-Phos-tag elektroforéza). Postup elektroforetické separace pomocí aparatury Mini-PROTEAN® TetraCell, Bio-Rad, je analogický postupu SDS-elektroforézy popsanému v oddílu 5.3.10 (s. 47). Byl použit stejný elektrodový pufr a zaostřovací gel, odlišné bylo pouze složení 10% separačního gelu – směs pro jeho vznik byla připravena smísením 3,3 ml pufru A [0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS], 1,65 ml polymerizačního roztoku A [30 % (w/v) akrylamid, 0,8 % (w/v) bis(akrylamid) v pufru A], 10 µl 100mM chloridu manganatého, 37,5 µl Phos-tag, 5 µl TEMED a 150 µl zásobního roztoku peroxodisírany amonného (100 mg ml⁻¹). Do jednotlivých jamek gelu bylo aplikováno vždy po 5 µl každého ze vzorků odebraných v průběhu experimentu popsaného v oddílu 5.3.9 (s. 47). Analogicky jako v postupu SDS-elektroforézy probíhala separace po dobu 70 minut při nastaveném napětí 200 V a byla zakončena inkubací gelu v barvicí lázni (InstantBlue™ Protein Stain, Sigma Aldrich). Výsledek analýzy byl zaznamenán po následné inkubaci gelu v deionizované vodě po dobu 16 hodin.

5.3.12 Spektrofotometrická analýza plasmidové DNA a proteinu eIF2α, resp. HRI

Stanovení čistoty a koncentrace amplifikovaného plasmidu pET-21c(+)/eIF2α (viz oddíl 5.3.4, s. 43) bylo provedeno na přístroji DS-11 Spectrophotometer (DeNovix) metodou „dsDNA“, při níž je měřena absorbance vzorku aplikovaného na detekční plochu při 260 nm A_{260} a při 280 nm A_{280} . Nejprve bylo provedeno měření absorbance 2,5 µl deionizované vody (pozadí) a následně absorbance 2,5 µl vzorku DNA. Čistota plasmidové DNA se hodnotí z poměru naměřených hodnot A_{260}/A_{280} . Hmotnostní koncentrace dvouřetězcové DNA $c_{m,DNA}$ (ng µl⁻¹) v roztoku se vypočte z absorbance A_{260} po odečtení absorbance pozadí, tloušťky absorpčního prostředí ($l = 0,05$ cm) a hmotnostního absorpčního koeficientu udaného výrobcem ($\epsilon_{m,260} = 0,02$ µl ng⁻¹ cm⁻¹) pomocí vztahu (16) (pozn.: je použit pojem „hmotnostní“ absorpční koeficient $\epsilon_{m,260}$ pro odlišení od „molárního“ absorpčního koeficientu ϵ_{280} uvedeného v dalším textu).

$$c_{m,DNA} = \frac{A_{260}}{\epsilon_{m,260} l}. \quad (16)$$

Podobně stanovení koncentrace proteinů eIF2α a HRI (viz oddíl 5.3.8, s. 45) bylo provedeno na přístroji DS-11 Spectrophotometer (DeNovix) metodou „Protein A280“, při níž je měřena absorbance vzorku aplikovaného na detekční plochu při 280 nm A_{280} .

Nejprve bylo provedeno měření absorbance 2,5 μl deionizované vody (pozadí) a následně absorbance 2,5 μl vzorku proteinu. Z absorbance A_{280} po odečtení absorbance pozadí, z tloušťky absorpčního prostředí ($l = 0,05 \text{ cm}$), molární hmotnosti daného proteinu M (g mol^{-1}) a molárního absorpčního koeficientu daného proteinu ε_{280} ($\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) byla získána hmotnostní koncentrace proteinu $c_{m,\text{prot}}$ (mg ml^{-1}) pomocí vztahu (17):

$$c_{m,\text{prot}} = \frac{A_{280}M}{\varepsilon_{280}l}. \quad (17)$$

Hodnoty M a ε_{280} byly pro oba proteiny získány pomocí predikčního nástroje ProtParam [161], který tyto údaje odhaduje na základě primární struktury proteinu. Primární struktura proteinů eIF2 α a HRI byla převzata z databáze UniProt [162]. Získané údaje jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Molární hmotnosti M a molární absorpční koeficienty ε_{280} při 280 nm proteinů eIF2 α . Hodnoty byly získány pomocí predikčního nástroje [161] na základě primární struktury proteinů převzaté z [162].

	M (g mol^{-1})	ε_{280} ($\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
eIF2 α	36 112	23 630
HRI	71 106	46 465

Pro účely charakterizace finálního preparátu proteinu HRI bylo provedeno měření jeho absorpčních spekter v různých podmínkách v intervalu vlnových délek 200–700 nm (spektrofotometr Cary 60 UV-VIS, Agilent). Z preparátu izolovaného HRI (40 μM) byl připraven roztok o celkovém objemu 1 ml a koncentraci HRI 5 μM ředěním pufrům použitým při izolaci tohoto proteinu (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl; viz oddíl 5.3.8, s. 45). Měření absorpčních spekter byla prováděna v 1 cm křemenné kyvetě, přičemž nejprve bylo získáno spektrum 1 ml pufru použitého k přípravě roztoku HRI (pozadí). Dále bylo zaznamenáno spektrum připraveného roztoku proteinu HRI s odečteným pozadím. Do roztoku v kyvetě byla poté přidávána dále uvedená činidla, přičemž po každém přidavku byla vzniklá směs krátce inkubována při laboratorní teplotě a vždy bylo následně zaznamenáno její absorpční spektrum s odečteným pozadím. Jednotlivá činidla byla přidávána v následujícím pořadí: 1) 2,5 μl 1 mM roztoku heminu; 2) malé množství krystalického dithioničitanu sodného; 3) malé množství oxidu uhelnatého. Nakonec bylo zaznamenáno také absorpční spektrum samotného 2,5 μM roztoku heminu v témže pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl).

6 Výsledky

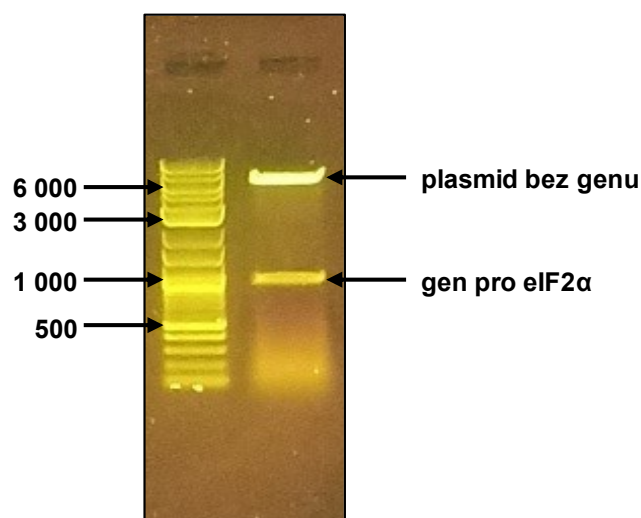
6.1 Amplifikace plasmidové DNA nesoucí gen pro eIF2 α

Za účelem amplifikace plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α byly tímto plasmidem transformovány buňky *E. coli* DH5 α (viz oddíl 5.3.2, s. 41). Na jednu agarovou plotnu obsahující ampicilin byla aplikována buněčná suspenze transformovaná plasmidem, na druhou plotnu byla aplikována buněčná suspenze bez plasmidu (negativní kontrola). Během inkubace se na první plotně vytvořilo přibližně 25 bakteriálních kolonií, zatímco na druhé plotně se nevytvořila žádná kolonie.

Z bakteriálních kolonií vyskytujících se na první plotně byla zvolena jedna kolonie, která byla ponechána inkubovat v LB médiu obsahujícím ampicilin. Po 16 hodinách inkubace byla provedena izolace plasmidové DNA podle postupu uvedeného v oddílu 5.3.4 (s. 43). Izolací byl získán preparát o objemu 50 μ l, pro nějž byl stanoven poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm $A_{260}/A_{280} = 1,94$ a hmotnostní koncentrace DNA 110 μ g μ l⁻¹ (viz oddíl 5.3.12, s. 50). Pro účely další analýzy byla požadována hodnota poměru A_{260}/A_{280} alespoň 1,6 a hmotnostní koncentrace DNA alespoň 10 μ g μ l⁻¹. Bylo tedy ověřeno, že získaný preparát je pro další analýzu vhodný.

Získaný preparát izolované plasmidové DNA byl podroben restrikčnímu štěpení endonukleasami *Nde*I a *Xho*I. Po inkubaci plasmidu s těmito endonukleasami byly produkty štěpení analyzovány pomocí elektroforézy na 1% agarosovém gelu a získaný elektroforeogram byl zaznamenán (viz Obrázek 4, s. 53). Do jamek agarosového gelu byl aplikován marker 2-log DNA Ladder (dráha vlevo) a vhodně naředěný vzorek preparátu izolované DNA (dráha vpravo). V pravé dráze lze pozorovat pruh v oblasti mobility standardu o délce 1 000 párů bází (gen pro eIF2 α 988 párů bází) a intenzivnější pruh v oblasti mobility standardu o délce 6 000 párů bází (plasmid pET-21c(+) bez genu pro eIF2 α má 5 441 párů bází).

Preparát izolované plasmidové DNA byl dále analyzován sekvenováním v Laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Získaná sekvence (data neuvedena) vykazovala po translaci do aminokyselinové sekvence 100% shodu s primární strukturou eIF2 α uvedenou v databázi [162].



Obrázek 4: Analýza produktů restrikčního štěpení plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α endonukleasami *Nde*I a *Xho*I pomocí agarosové elektroforézy. V levé dráze jsou standardy o uvedených délkách párů bází (2-log ladder DNA marker), v pravé dráze jsou separovány produkty restrikčního štěpení.

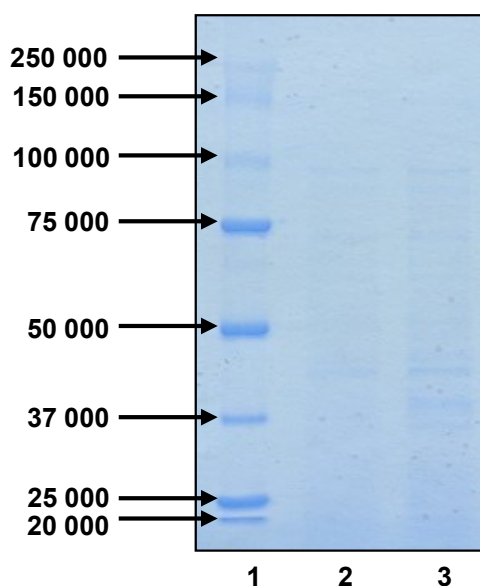
6.2 Expres proteinu eIF2 α

K expresi proteinu eIF2 α byla využita transformace buněk *E. coli* BL-21(DE3) plasmidem pET-21c(+)/eIF2 α (viz oddíl 5.3.2, s. 41). Na jednu agarovou plotnu obsahující ampicilin byla aplikována buněčná suspenze transformovaná plasmidem, na druhou plotnu byla aplikována buněčná suspenze bez plasmidu (negativní kontrola). Během inkubace se na první plotně vytvořilo přibližně 30 bakteriálních kolonií, zatímco na druhé plotně se nevytvořila žádná kolonie.

Z bakteriálních kolonií vyskytujících se po inkubaci na první ampicilinové plotně byla zvolena jedna kolonie, která byla ponechána inkubovat v LB médiu obsahujícího ampicilin. Po 16 hodinách inkubace byly transformované buňky inokulovány do 8 l TB média. Po 3,5 hodinách inkubace byla naměřena optická hustota 0,90. Následně byl do suspenze přidán IPTG a inkubace byla ukončena po 16 hodinách centrifugací buněk. Získáno bylo 40,8 g buněk z 8 l TB média.

Postup exprese proteinu HRI byl opakován s využitím již jednou provedené transformace buněk, ale tentokrát byla použita jiná transformovaná bakteriální kolonie, která byla dále inkubována v LB médiu a následně transformována do TB média o objemu 8 l. Po 3,5 hodinách inkubace bylo dosaženo optické hustoty 1,10, a dále byla indukována exprese proteinu eIF2 α přidávkem IPTG. Po 16 hodinách byla exprese přerušena centrifugací buněk. Při této druhé expresi bylo získáno 49,3 g buněk z 8 l TB média. Výtěžky buněk z obou expresí byly spojeny, celkem tedy bylo z obou experimentů získáno 90,1 g buněk z 16 l TB média, tj. 5,6 g buněk na 1 l TB média.

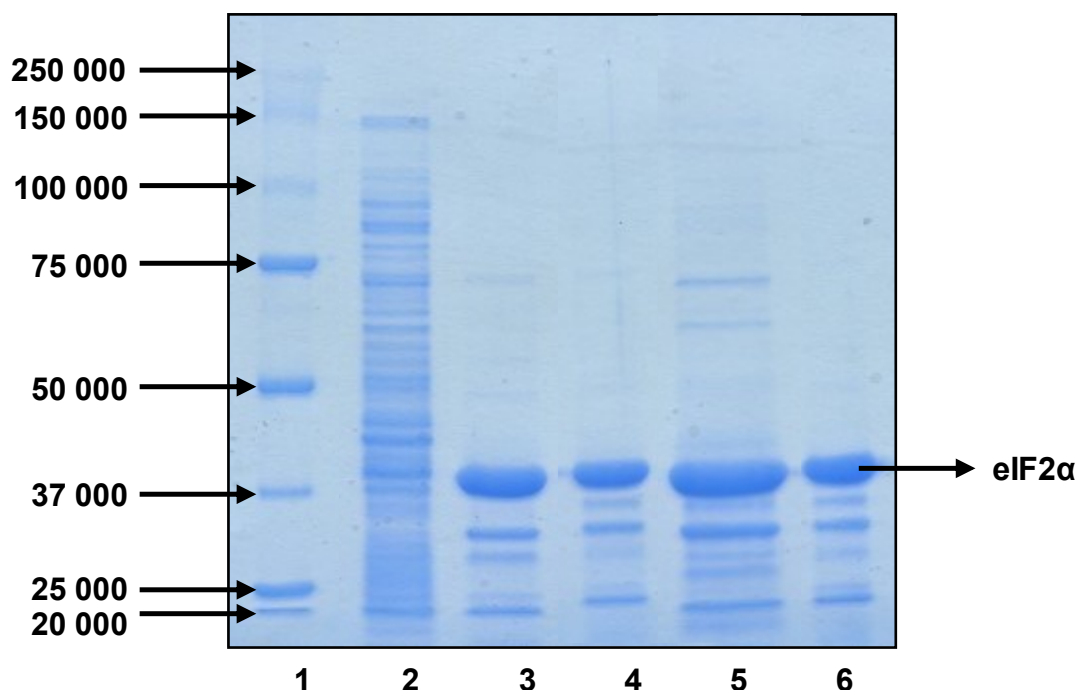
Před izolací proteinu ze získaného preparátu byla provedena elektroforetická analýza vzorků buněčné suspenze odebraných před přidavkem IPTG a po něm, tj. před ukončením exprese proteinu eIF2 α (vzorky byly odebrány během prvního z obou experimentů). Záznam získaného elektroforeogramu je na Obrázku 5. Složení obou vzorků je spolu s postupem SDS-elektroforézy popsáno v oddílu 5.3.10 (s. 47). Pruhy v drahách 2 a 3 mají velmi nízkou intenzitu, avšak v dráze č. 3 (buněčná suspenze po indukce exprese) lze pozorovat pruh v oblasti mobility standardu o molární hmotnosti 37 000 g mol⁻¹ (molární hmotnost eIF2 α je přibližně 36 000 g mol⁻¹).



Obrázek 5: Analýza vzorků odebraných během první exprese proteinu eIF2 α pomocí SDS-elektroforézy. Vzorky aplikované do jednotlivých jamek: **1** – marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards (uvedeny jsou molární hmotnosti standardů v jednotkách g mol⁻¹); **2** – bakterie *E. coli* BL-21(DE3) před přidavkem IPTG; **3** – bakterie *E. coli* BL-21(DE3) po přidavku IPTG před ukončením exprese proteinu eIF2 α .

6.3 Izolace proteinu eIF2 α

Protein eIF2 α byl ze získaného buněčného preparátu o celkové hmotnosti 90,1 g izolován postupem popsáním v oddílu 5.3.8 (s. 45). V průběhu izolace proteinu byly odebrány vzorky pro analýzu SDS-elektroforézou a získaný elektroforeogram byl zaznamenán (viz Obrázek 6, s. 55). Do jamky č. 1 byl aplikován marker pro kalibraci molárních hmotností Precision Plus Protein™ Unstained Standards, do dalších jamek byly aplikovány vzorky preparátů získaných jednotlivými izolačními kroky. Složení těchto vzorků spolu s postupem SDS-elektroforézy je popsáno v oddílu 5.3.10 (s. 47).

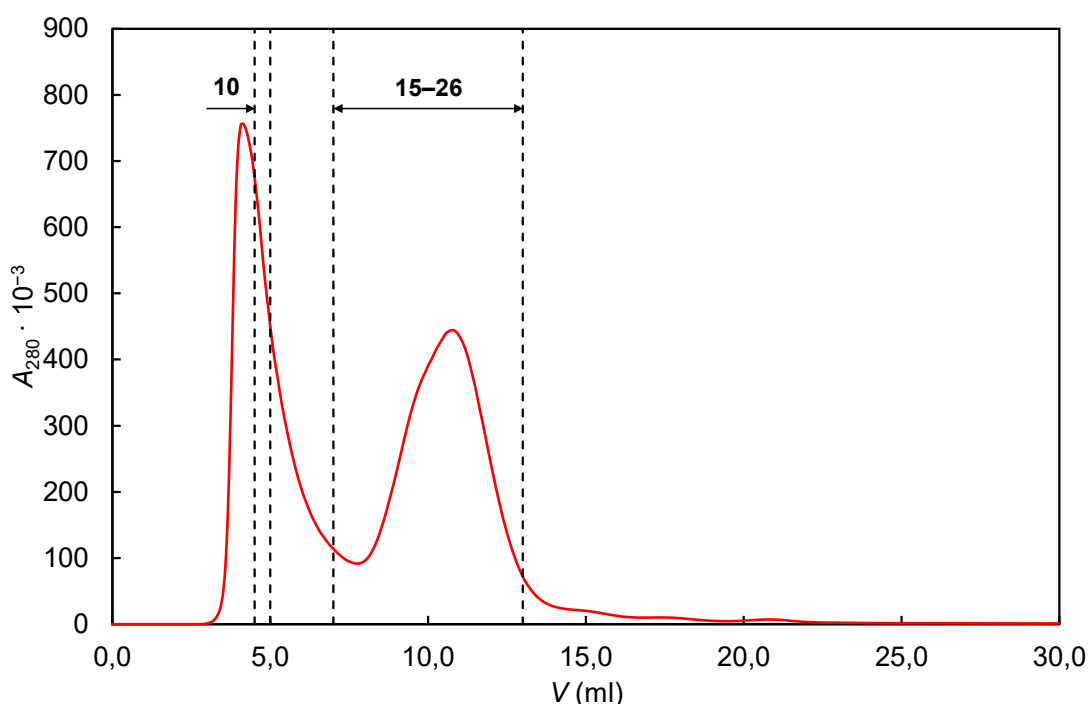


Obrázek 6: Analýza vzorků odebraných během izolace proteinu eIF2 α pomocí SDS-elektroforézy. Vzorky aplikované do jednotlivých jamek: **1** – marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards (uvedeny jsou molární hmotnosti standardů v jednotkách g mol⁻¹); **2** – supernatant získaný při ultracentrifugaci sonikované buněčné suspenze; **3** – eluát v elučním pufru získaný po afinitní chromatografii; **4** – eluát v elučním pufru získaný po afinitní chromatografii s redukovaným objemem; **5** – frakce č. 10 odebraná při purifikaci proteinu eIF2 α gelovou permeační chromatografií (objem redukován); **6** – konečný produkt získaný spojením frakcí č. 15–26 odebraných při purifikaci proteinu eIF2 α gelovou permeační chromatografií (objem spojených frakcí byl redukován).

Po prvním izolačním kroku, centrifugaci, byl vzorek odebraného supernatantu aplikován do jamky č. 2 (viz Obrázek 6), přičemž v této dráze lze kromě pruhu odpovídajícího exprimovanému proteinu o molární hmotnosti okolo 37 000 g mol⁻¹ (molární hmotnost eIF2 α je přibližně 36 000 g mol⁻¹) pozorovat pruhy příslušející řadě dalších proteinů. Po následné inkubaci s afinitním nosičem a analýze pomocí afinitní chromatografie byl získán eluát v elučním pufru, který byl aplikován do jamky č. 3 (viz Obrázek 6). Oproti dráze č. 2 došlo k výraznému zvýšení intenzity pruhu v oblasti mobility standardu o molární hmotnosti 37 000 g mol⁻¹ a k současnému vymizení pruhů v oblasti vyšších molárních hmotností. V dráze č. 4 (eluát v elučním pufru, jehož objem byl redukován filtrací na membráně zachycující proteiny o molární hmotnosti vyšší než 20 000 g mol⁻¹, viz Obrázek 6) došlo dále k vymizení některých pruhů v oblasti mobility standardů o molárních hmotnostech nižších než 37 000 g mol⁻¹.

K purifikaci proteinu byla v dalším postupu využita gelová permeační chromatografie sledovaná pomocí spektrofotometrické detekce (absorbance při 280 nm, záznam je

na Obrázku 7). Jímány byly společně frakce č. 15–26 (eluční objem 7,0–13,0 ml) a mimoto byla samostatně jímána frakce č. 10 (eluční objem 4,5–5,0 ml). Oba získané vzorky byly dále samostatně zpracovány filtrací na membráně zadržující proteiny o molární hmotnosti vyšší než $20\,000\text{ g mol}^{-1}$ a následnou redukcí objemu filtrátu. Oba preparáty byly konečně analyzovány pomocí SDS-elektroforézy (viz Obrázek 6, s. 55; zpracovaná frakce č. 10 byla aplikována do jamky č. 5, zpracované frakce č. 15–26 do jamky č. 6). Pruhy v oblasti mobility standardu o molární hmotnosti blízké $37\,000\text{ g mol}^{-1}$ lze pozorovat v dráze č. 5 i 6, nicméně v dráze č. 6 nepozorujeme některé pruhy v oblasti mobility standardů o molárních hmotnostech vyšších než $37\,000\text{ g mol}^{-1}$.



Obrázek 7: Záznam z purifikace proteinu eIF2 α gelovou permeační chromatografií, jejíž průběh byl sledován pomocí spektrofotometrické detekce (absorbance při 280 nm). Vyznačena je frakce č. 10 (eluční objem 4,5–5,0 ml) a frakce č. 15–26 (eluční objem 7,0–13,0 ml), které byly odebrány pro další zpracování.

Konečným produktem izolace byly zpracované frakce č. 15–26, jejichž celkový objem byl redukován na 240 μl . V tomto konečném preparátu byla stanovena hmotnostní koncentrace proteinu eIF2 α měřením absorbance při 280 nm (viz oddíl 5.3.12, s. 50). Byla zjištěna hodnota hmotnostní koncentrace 37 mg ml^{-1} (998 μM), tj. v preparátu o objemu 240 μl bylo obsaženo 8,9 mg proteinu eIF2 α . Z 1 g buněk tedy bylo izolováno 99 μg proteinu eIF2 α ; z 1 l TB média bylo izolováno 560 μg proteinu eIF2 α . Analýzou získaného elektroforeogramu pomocí softwaru ImageJ bylo odhadnuto hmotnostní procento proteinu eIF2 α v konečném produktu větší než 90 %.

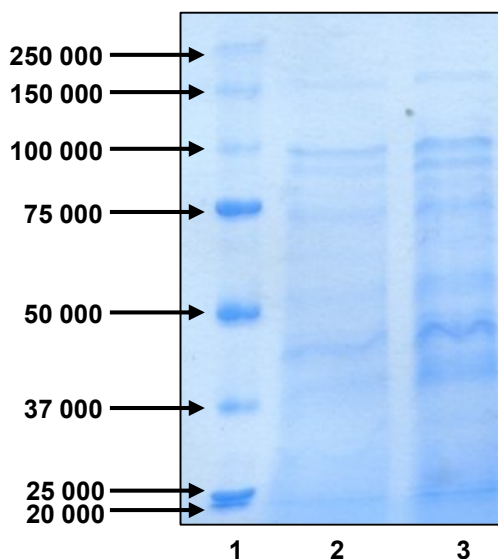
6.4 Exprese proteinu HRI

K expresi proteinu HRI byla využita transformace buněk *E. coli* BL-21(DE3) plasmidem pET-21c(+)/HRI (viz oddíl 5.3.2, s. 41). Na jednu agarovou plotnu obsahující ampicilin byla aplikována buněčná suspenze transformovaná plasmidem, na druhou plotnu byla aplikována buněčná suspenze bez plasmidu (negativní kontrola). Během inkubace se na první plotně vytvořilo přibližně 25 bakteriálních kolonií, zatímco na druhé plotně se nevytvořila žádná kolonie.

Z bakteriálních kolonií vyskytujících se po inkubaci na první ampicilinové plotně byla zvolena jedna kolonie, která byla ponechána inkubovat v LB médiu obsahujícím ampicilin. Po 16 hodinách inkubace byly transformované buňky inokulovány do 8 l TB média. Po 3,5 hodinách inkubace byla naměřena optická hustota 0,85. Následně byl do suspenze přidán IPTG a inkubace byla ukončena po 16 hodinách centrifugací buněk. Získáno bylo 38,2 g buněk z 8 l TB média.

Postup exprese proteinu HRI byl opakován s využitím již jednou provedené transformace buněk, ale tentokrát byla použita jiná transformovaná bakteriální kolonie, která byla dále inkubována v LB médiu a následně transformována do TB média o objemu 8 l. Po 3,5 hodinách inkubace bylo dosaženo optické hustoty 0,75, a dále byla indukována exprese proteinu HRI přidavkem IPTG. Po 16 hodinách byla exprese přerušena centrifugací buněk. Při této druhé expresi bylo získáno 50,4 g buněk z 8 l TB média. Výtěžky buněk z obou expresí byly spojeny, celkem tedy bylo z obou experimentů získáno 88,6 g buněk z 16 l TB média, tj. 5,5 g buněk na 1 l TB média.

Před izolací proteinu ze získaného preparátu byla provedena elektroforetická analýza vzorků buněčné suspenze odebraných před přidavkem IPTG a po něm, tj. před ukončením exprese proteinu HRI (vzorky byly odebrány během prvního z obou experimentů). Záznam získaného elektroforeogramu je na Obrázku 8 (s. 58). Složení obou vzorků je spolu s postupem SDS-elektroforézy popsáno v oddílu 5.3.10 (s. 47). V dráze č. 3 je oproti dráze č. 2 patrný nárůst intenzity pruhu v oblasti mobility standardu o molární hmotnosti $75\,000\text{ g mol}^{-1}$ (molární hmotnost HRI je přibližně $71\,000\text{ g mol}^{-1}$).

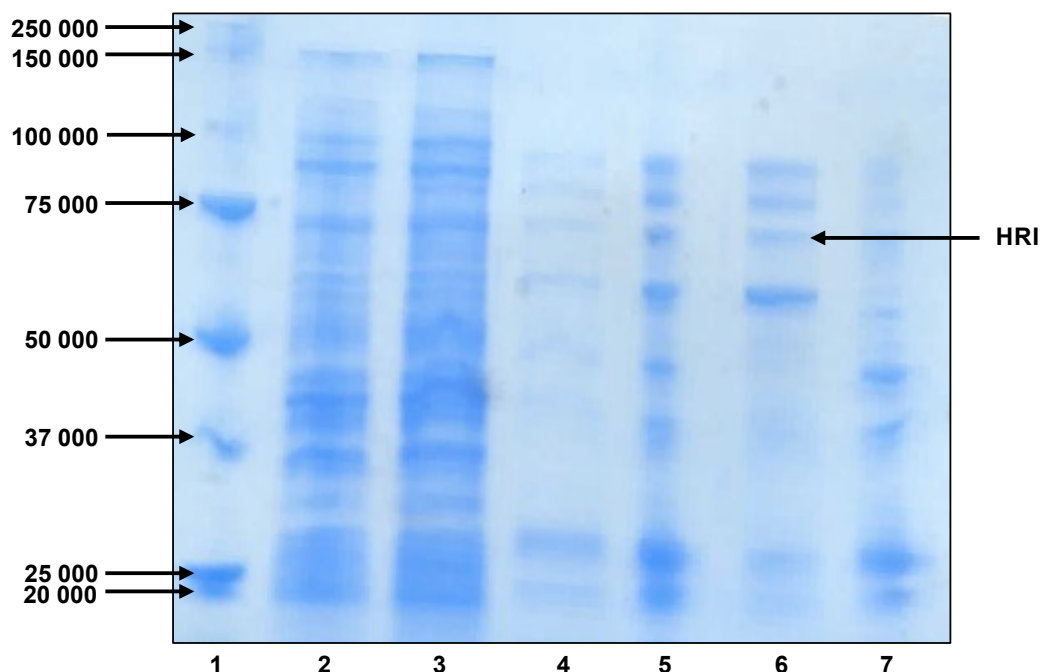


Obrázek 8: Analýza vzorků odebraných během první exprese proteinu HRI pomocí SDS-elektroforézy. Vzorky aplikované do jednotlivých jamek: **1** – marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards (uvedeny jsou molární hmotnosti standardů v jednotkách g mol^{-1}); **2** – bakterie *E. coli* BL-21(DE3) před přidavkem IPTG; **3** – bakterie *E. coli* BL-21(DE3) po přidavku IPTG před ukončením exprese proteinu HRI.

6.5 Izolace proteinu HRI

Protein HRI byl ze získaného buněčného preparátu o celkové hmotnosti 88,6 g izolován postupem popsáním v oddílu 5.3.8 (s. 45). V průběhu izolace proteinu byly odebrány vzorky pro analýzu SDS-elektroforézou a získaný elektroforeogram byl zaznamenán (viz Obrázek 9, s. 59). Do jamky č. 1 byl aplikován marker pro kalibraci molárních hmotností Precision Plus Protein™ Unstained Standards, do dalších jamek byly aplikovány vzorky preparátů získaných jednotlivými izolačními kroky. Složení těchto vzorků spolu s postupem SDS-elektroforézy je popsáno v oddílu 5.3.10 (s. 47).

Po prvním izolačním kroku, centrifugaci, byl vzorek odebraného supernatantu aplikován do jamky č. 2 (viz Obrázek 9, s. 59), přičemž v této dráze lze kromě pruhu odpovídajícího exprimovanému proteinu o molární hmotnosti okolo $75\,000\text{ g mol}^{-1}$ (molární hmotnost HRI je přibližně $71\,000\text{ g mol}^{-1}$) pozorovat pruhy příslušející řadě dalších proteinů. Tyto pruhy mají oproti vzorku buněčné suspenze před ukončením exprese (dráha č. 3 v gelu na Obrázku 8, s. 58) vyšší intenzitu.



Obrázek 9: Analýza vzorků odebraných během izolace proteinu HRI pomocí SDS-elektroforézy. Vzorky aplikované do jednotlivých jamek: **1** – marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards (uvedeny jsou molární hmotnosti standardů v jednotkách g mol^{-1}); **2** – supernatant získaný při ultracentrifugaci sonikované buněčné suspenze; **3** – roztok, který neinteragoval s afinitním nosičem; **4** – eluát v elučním pufru získaný po afinitní chromatografii; **5** – eluát v elučním pufru získaný po afinitní chromatografii s redukováným objemem; **6** – produkt získaný spojením frakcí č. 13–19 odebraných při purifikaci proteinu HRI gelovou permeační chromatografií (objem spojených frakcí byl redukován); **7** – produkt získaný spojením frakcí č. 20–25 odebraných při purifikaci proteinu HRI gelovou permeační chromatografií (objem spojených frakcí byl redukován).

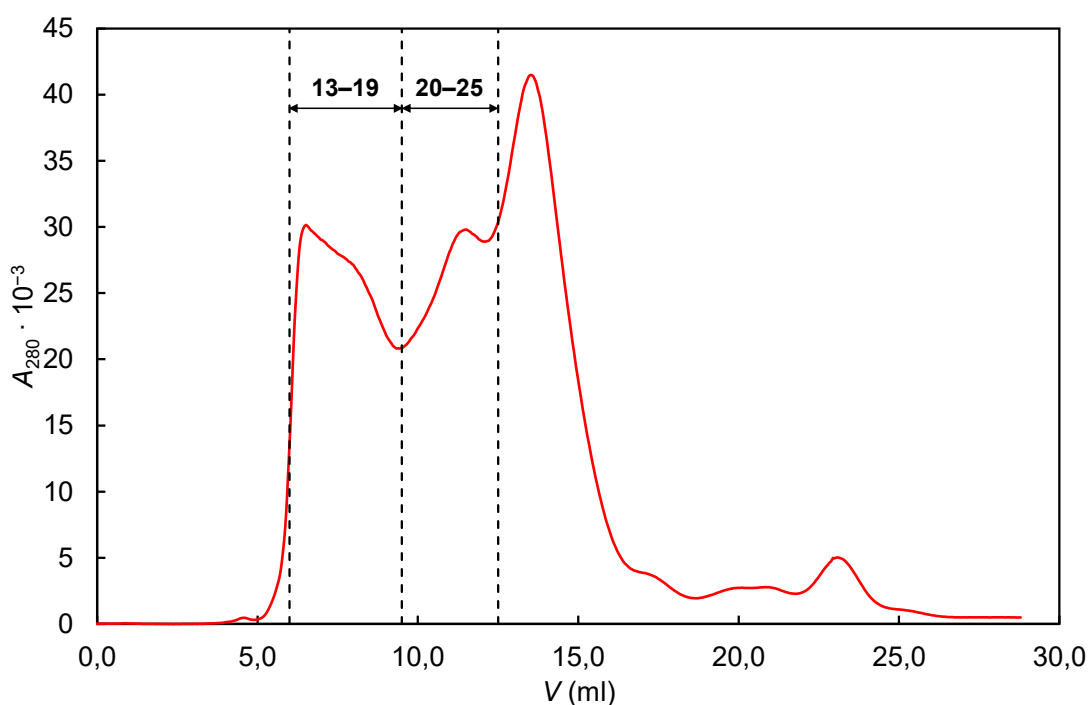
Po následné inkubaci s afinitním nosičem byl odebrán vzorek, který s tímto nosičem neinteragoval (dráha č. 3 na Obrázku 9), přičemž i v jeho dráze je přítomna řada pruhů odpovídající proteinům vyšších i molárních hmotností než $75\,000\text{ g mol}^{-1}$. Po promytí kolony elučním pufrem byl odebrán vzorek, který byl aplikován do jamky č. 4 (viz Obrázek 9). Oproti dráze č. 3 je v dráze č. 4 patrné vymizení řady pruhů, v obou drahách lze nicméně pozorovat pruh v oblasti mobility standardu o molární hmotnosti $75\,000\text{ g mol}^{-1}$.

Oproti dráze č. 4 došlo v dráze č. 5 (eluát v elučním pufru, jehož objem byl redukován filtrací na membráně zachycující proteiny o molární hmotnosti vyšší než $30\,000\text{ g mol}^{-1}$, viz Obrázek 9) ke zvýšení intenzity jednotlivých pruhů (opět v oblasti vyšší i nižší molární hmotnosti než $75\,000\text{ g mol}^{-1}$).

K purifikaci proteinu byla v dalším postupu využita gelová permeační chromatografie sledovaná pomocí spektrofotometrické detekce (absorbance při 280 nm , záznam je na Obrázku 10, s. 60). Jímány byly zvláště spojené frakce č. 13–19 (eluční objem

6,0–9,5 ml) a spojené frakce č. 20–25 (eluční objem 9,5–12,5 ml). Oba získané vzorky byly dále samostatně zpracovány filtrací na membráně zadržující proteiny o molární hmotnosti vyšší než $30\,000\text{ g mol}^{-1}$ a následnou redukcí objemu filtrátu. Oba preparáty byly konečně analyzovány pomocí SDS-elektroforézy (viz Obrázek 9, s. 59; zpracované frakce č. 13–19 byly aplikovány do jamky č. 6, zpracované frakce č. 20–25 do jamky č. 7). V dráze č. 6 i 7 lze pozorovat pruh v oblasti mobility standardu molární hmotnosti $75\,000\text{ g mol}^{-1}$, přičemž v dráze č. 6 je tento pruh mírně intenzivnější. V obou drahách pozorujeme také pruhy v oblasti vyšších i nižších molárních hmotností, avšak v dráze č. 7 mají tyto pruhy obecně vyšší intenzitu.

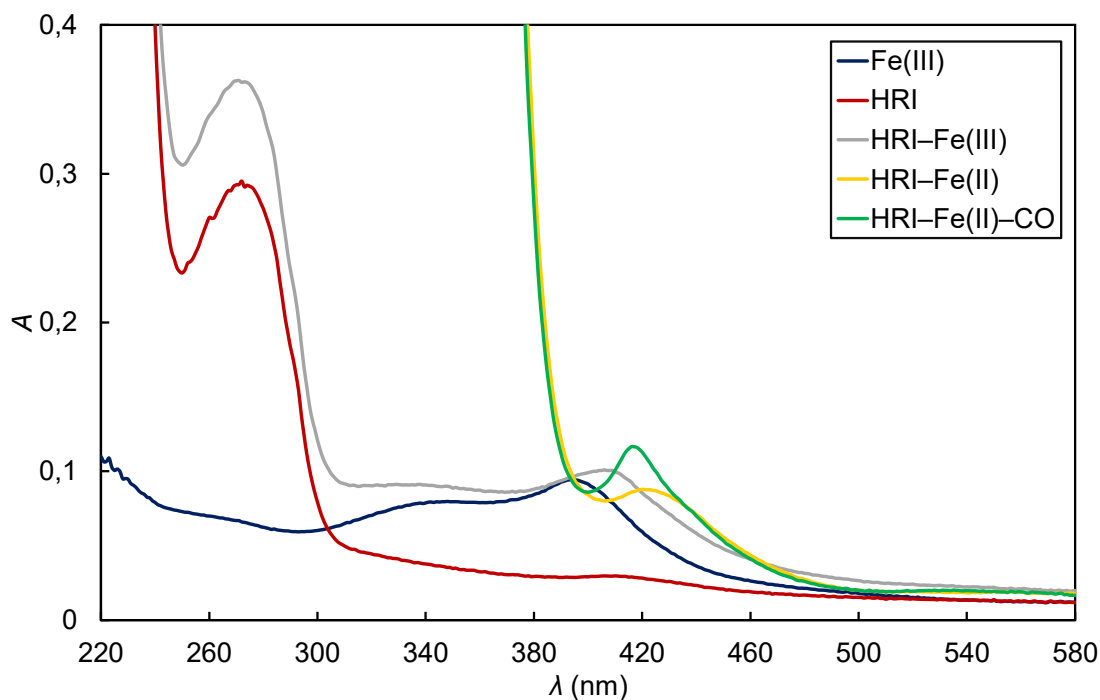
Konečným produktem izolace byly zpracované frakce č. 13–19, jejichž celkový objem byl redukován na 140 μl . V tomto konečném preparátu byla stanovena hmotnostní koncentrace proteinu HRI měřením absorbance při 280 nm (viz oddíl 5.3.12, s. 50). Byla zjištěna hodnota hmotnostní koncentrace $2,9\text{ }\mu\text{g }\mu\text{l}^{-1}$ (40 μM), tj. v preparátu o objemu 140 μl bylo obsaženo 406 μg proteinu HRI. Z 1 g buněk tedy bylo izolováno 4,6 μg proteinu HRI; z 1 l TB média bylo izolováno 25 μg proteinu HRI. Analýzou získaného elektroforeogramu pomocí softwaru ImageJ bylo odhadnuto hmotnostní procento proteinu eIF2 α v konečném produktu 20 %.



Obrázek 10: Záznam z purifikace proteinu HRI gelovou permeační chromatografií, jejíž průběh byl sledován pomocí spektrofotometrické detekce (absorbance při 280 nm). Vyznačeny jsou frakce č. 13–19 (eluční objem 6,0–9,5 ml) a frakce č. 20–25 (eluční objem 9,5–12,5 ml), které byly odebrány pro další zpracování.

6.6 Spektrofotometrická charakterizace proteinu HRI

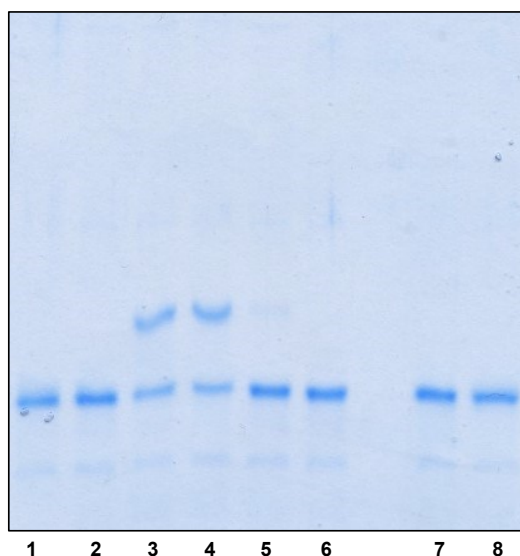
Preparát získaný izolací proteinu HRI byl analyzován měřením absorpčních spekter roztoků připravených podle postupu popsaného v oddílu 5.3.12 (s. 50). Získaná spektra s odečteným pozadím (čistý pufr použitý při izolaci proteinu HRI) jsou znázorněna na Obrázku 11. Z těchto spekter byly odečteny vlnové délky odpovídající maximům v Soretově oblasti – 394 nm pro čistý hemin; 410 nm pro protein HRI izolovaný v jeho apoformě; 406 nm pro izolovaný protein HRI inkubovaný s heminem; 420 nm pro izolovaný protein HRI inkubovaný s heminem a dithioničitanem sodným; 416 nm pro izolovaný protein HRI inkubovaný s heminem, dithioničitanem sodným a oxidem uhelnatým. V oblasti Q pásů byla absorbance ve všech případech velmi nízká. Analýzou spekter byla v této oblasti nalezena maxima pouze pro 1) izolovaný protein HRI inkubovaný s heminem a dithioničitanem sodným (525 nm, 555 nm) a pro 2) izolovaný protein HRI inkubovaný s heminem, dithioničitanem sodným a oxidem uhelnatým (535 nm a 564 nm).



Obrázek 11: Analýza preparátu získaného při izolaci proteinu HRI měřením absorpčních spekter v ultrafialové a viditelné oblasti. Jednotlivé vzorky (v závorce je uvedena poloha Soretova pásu): **modře** – roztok heminu (2,5 μ M) (394 nm); **červeně** – roztok izolovaného proteinu HRI (5 μ M) (410 nm); **šedě** – směs izolovaného proteinu HRI (5 μ M) a heminu (2,5 μ M) (406 nm); **žlutě** – směs izolovaného proteinu HRI (5 μ M) a heminu (2,5 μ M) s přidavkem dithioničitanu sodného (420 nm); **zeleně** – směs izolovaného proteinu HRI (5 μ M) a heminu (2,5 μ M) s přidavkem dithioničitanu sodného a oxidu uhelnatého (416 nm).

6.7 Studium vlivu donorů fosfátu na fosforylaci proteinu eIF2 α v přítomnosti a absenci proteinu HRI

Preparáty získané během izolací proteinů eIF2 α a HRI byly využity ke studiu vlivu donorů fosfátu na fosforylaci proteinu eIF2 α podle postupu popsáno v oddílu 5.3.9 (s. 47). V průběhu experimentů byly odebrány vzorky pro analýzu SDS-Phos-tag elektroforézou a získaný elektroforeogram byl zaznamenán (viz Obrázek 12). Do dráhy č. 1 a č. 7 byl aplikován roztok proteinu eIF2 α v pufru použitým při jeho izolaci, do dráhy č. 2 byla aplikována směs proteinů eIF2 α a HRI a do dráhy č. 3–6 byly aplikovány směsi proteinů eIF2 α a HRI inkubované s jednotlivými nukleosidtrifosfáty (ATP, GTP, UTP, CTP). Do dráhy č. 8 byla aplikována směs eIF2 α a fosfoenolpyruvátu. Přesné složení těchto vzorků je popsáno v oddílu 5.3.9 (s. 47), postup SDS-Phos-tag elektroforézy v oddílu 5.3.11 (s. 50).



Obrázek 12: Analýza vzorků odebraných z jednotlivých inkubačních směsí při studiu vlivu donorů fosfátu na fosforylaci proteinu eIF2 α pomocí SDS-Phos-tag elektroforézy. Vzorky aplikované do jednotlivých jamek: **1** – protein eIF2 α ; **2** – směs proteinů eIF2 α a HRI; **3** – směs proteinů eIF2 α a HRI s přidavkem ATP; **4** – směs proteinů eIF2 α a HRI s přidavkem GTP; **5** – směs proteinů eIF2 α a HRI s přidavkem UTP; **6** – směs proteinů eIF2 α a HRI s přidavkem CTP; **7** – protein eIF2 α ; **8** – protein eIF2 α s přidavkem fosfoenolpyruvátu.

Ve všech drahách pozorujeme jeden výrazný proužek v oblasti těžé mobility, pouze v drahách č. 3 a 4 se současně vyskytuje další proužek v oblasti nižší mobility. Intenzita proužků je v drahách č. 1–2 a 5–8 obdobná; mírně nižší je intenzita proužků v drahách č. 3 a 4. Oba výrazné proužky v těchto drahách však mají intenzity vzájemně srovnatelné. Ve všech drahách se mimoto vyskytuje jeden slabý proužek v podobné oblasti vyšší mobility oproti výše diskutovaným proužkům.

7 Diskuse

Ústředním cílem této bakalářské práce byla příprava eukaryotického hemového sensorového proteinu HRI a jeho substrátu eIF2 α . Hemové sensorové proteiny plní řadu významných úloh v prokaryotických i eukaryotických organismech, přičemž o strukturně-funkčních vztazích, jakož i o mechanismech a významu jejich působení jsou stále doplňovány chybějící poznatky (např. přenos signálu ze sensorové do funkční domény, regulace jejich aktivity pomocí efektorů) [119]. V případě rodiny savčích kinas fosforylujících protein eIF2 α (HRI, PKR, PERK, GCN2), jejichž společnou funkcí je zajištění integrované stresové odpovědi, je též studována podstata jejich zapojení do procesu karcinogeneze [163]. Například pro budoucí účely protinádorového cílení je přitom nutná detailní charakterizace jak těchto kinas, tak jejich substrátu, proteinu eIF2 α . Bližší charakterizace jednotlivých proteinů i jejich vzájemných interakcí pak není možná bez jejich izolace z biologického materiálu, nebo jejich přípravy rekombinantní expresí.

Určitou překážkou ve studiu eukaryotických hemových sensorových proteinů je skutečnost, že příprava i charakterizace eukaryotických proteinů je obecně náročnější a citlivější na podmínky, než je tomu v případě prokaryotických proteinů. V naší laboratoři proto využíváme prokaryotické sensorové proteiny jako modelové systémy (např. studium bakteriálních sensorů plynů [119]). Pomocí těchto prokaryotických modelových systémů byly optimalizovány experimentální postupy, které se nyní snažíme uplatnit pro získávání poznatků o eukaryotických hemových sensorových proteinech. Takto byly připraveny a charakterizovány proteiny Bach1 [164], p53 [165] a částečně eIF2 α [166], jako problematická se však ukázala příprava proteinu HRI [166]. Pro další experimenty je proto třeba připravit proteiny eIF2 α a HRI v dostatečném množství a čistotě.

7.1 Amplifikace plasmidové DNA a kontrola její autenticity

K přípravě proteinů eIF2 α a HRI byl využit plasmid pET-21c(+) nesoucí gen pro eIF2 α , resp. HRI (viz oddíl 5.1, s. 37), přičemž oba plasmidy byly poskytnuty spolupracující laboratoří. V některých studiích byl k expresi proteinů eIF2 α a HRI využit plasmid pET-28a [167], který kromě genu pro C-koncovou histidinovou kotvu nese rovněž gen pro vazebné místo pro proteasu, pomocí níž lze histidinovou kotvu z purifikovaného proteinu odstranit (viz též oddíl 7.3, s. 66) [167]. Plasmidy pET-21c(+) byly nicméně rovněž v expresi hemových sensorových proteinů úspěšně uplatněny [168]. Tyto plasmidy lze dlouhodobě skladovat a amplifikovat, je však vhodné průběžně ověřovat

autenticitu vloženého genu pro daný protein. V této práci byl této analýze podroben plasmid nesoucí gen pro protein eIF2 α .

K amplifikaci plasmidové DNA byly využity buňky *E. coli* DH5 α , které mají díky bodové mutaci *endA1* potlačenou aktivitu intracelulární endonukleasy, a umožňují tak produkci dostatečného množství plasmidu, aniž by došlo k jeho degradaci [169]. Po inkubaci buněk DH5 α transformovaných plasmidem pET-21c(+)/eIF2 α byl následnou izolací získán preparát plasmidové DNA o dostatečném množství a čistotě (viz oddíl 6.1, s. 52), vhodnost zvoleného bakteriálního kmene byla tedy potvrzena.

Preparát amplifikovaného plasmidu byl nejprve analyzován pomocí restriční štěpení (záznam následné analýzy pomocí agarosové elektroforézy je na Obrázku 4, s. 53). O úspěšnosti restriční štěpení plasmidu i o autenticitě vloženého genu pro eIF2 α svědčí přítomnost pruhu v oblasti mobility standardu o 1 000 párech bází (gen pro eIF2 α má 988 párů bází). V získaném elektroforeogramu je rovněž přítomen pruh v oblasti mobility standardu o 6 000 párech bází. Lze předpokládat, že tento pruh přísluší linearizovanému plasmidu bez genu pro eIF2 α (který má 5 441 párů bází), tj. dalšímu produktu restriční štěpení. V uvedené oblasti mobility by teoreticky mohl být též přítomen výchozí (popř. pouze linearizovaný) plasmid (6 429 párů bází), který nepodlehł štěpení, avšak protože v dráze pozorujeme pouze dva výrazné pruhy namísto tří, je pravděpodobnější první uvedené vysvětlení. Méně výrazné pruhy v oblasti mobility standardů o nižších počtech párů bází pravděpodobně přísluší dalším menším oligonukleotidovým fragmentům vzniklým při restričním štěpení.

Autenticitu vloženého genu v plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α potvrdily rovněž výsledky druhé použité metody, sekvenování tohoto amplifikovaného plasmidu v Laboratoři sekvenace DNA (ukázala se 100% shoda zjištěné nukleotidové sekvence převedené do odpovídající aminokyselinové sekvence s primární strukturou proteinů eIF2 α). Tento plasmid tedy byl vhodný k expresi proteinu eIF2 α .

7.2 Exprese proteinu eIF2 α , resp. HRI

K expresi eukaryotických proteinů eIF2 α a HRI byly využity buňky *E. coli* BL-21(DE3), jeden z nejčastěji uplatňovaných kmenů pro účely rekombinantní exprese, díky absenci klíčových proteas *lon* a *ompT* [170]. Ačkoli byly prokaryotické bakterie *E. coli* BL-21(DE3) i v předchozích pracích úspěšně využity k expresi eukaryotických senzorů [165], bylo by vhodné v rámci dalšího výzkumu testovat využití dalších bakteriálních kmenů. Nedávná studie např. ukázala vyšší účinnost kmene *E. coli* HMS174(DE3) oproti kmenu BL-21(DE3) na modelových zástupcích eukaryotických

proteinů [171], což by mohlo být relevantní i pro účely exprese eukaryotických proteinů eIF2 α a HRI. Ještě vhodnější alternativou by bylo využití eukaryotického expresního systému, toto řešení by však vyžadovalo zcela novou optimalizaci experimentálního procesu.

Je pravděpodobné, že transformace buněk *E. coli* BL-21(DE3) plasmidem pET-21c(+)/eIF2 α , resp. pET-21c(+)/HRI, proběhla úspěšně. Tuto domněnku potvrzuje skutečnost, že v obou případech došlo k nárůstu bakteriálních kolonií na té agarové plotně obsahující ampicilin, na níž byla aplikována buněčná suspenze s přídavkem plasmidu (viz oddíl 5.3.3, s. 42). Na druhé plotně (negativní kontrola) naopak k nárůstu kolonie nedošlo, neboť buňky nebyly vybaveny genem pro β -laktamasu zajišťujícím rezistenci k ampicilinu (gen je součástí plasmidu pET-21c(+)) [172].

Měřítkem míry nárůstu buněčné kultury po inokulaci TB média jednobuněčnou kolonií je optická hustota při 600 nm, která dosáhla vyšší hodnoty v případě eIF2 α (0,90 při první a 1,10 při druhé expresi) než v případě HRI (0,85 při první a 0,75 při druhé expresi). O výraznějším nárůstu buněk při expresi eIF2 α svědčí také vyšší celková hmotnost buněčného preparátu získaného při obou expresích (90,1 g) než v případě HRI (88,6 g). Tento jev nemůže být vysvětlen odlišnou mírou potenciální toxicity rekombinantních proteinů pro buňky *E. coli*, protože uvedených hodnot bylo dosaženo před indukcí exprese obou proteinů. Pro vyhodnocení, zda je rozdíl statisticky významný, by bylo nutné provést větší počet experimentů. V tuto chvíli se lze pouze domnívat, že se jedná o projev rozptylu hodnot v rámci opakovaných experimentů.

V případě obou proteinů se také potvrdil význam kroku indukce exprese proteinu přídavkem IPTG, který aktivuje *lac* operon regulující expresi T7 RNA polymerasy (T7 RNA polymerasa se po této aktivaci váže na T7 promotor plasmidu pET-21c(+), čímž indukuje expresi daného proteinu [173]). O účinnosti této aktivace svědčí zvýšení intenzity pruhů v dráze č. 3 (vzorek buněčné suspenze po přídavku IPTG) oproti dráze č. 2 (vzorek buněčné suspenze před přídavkem IPTG), které bylo pozorováno v elektroforeogramu získaném po expresi jak proteinu eIF2 α (Obrázek 5, s. 54), tak proteinu HRI (Obrázek 8, s. 58). Zvýšení intenzity pruhů nastalo v případě indukce exprese proteinů nejen v očekávané oblasti (36 000 g mol⁻¹ v případě eIF2 α , 71 000 g mol⁻¹ v případě HRI), ale také v oblasti mobility standardů o vyšších i nižších molárních hmotnostech. Lze tedy usuzovat, že protein eIF2 α i protein HRI je v cytosolu bakterií exprimován s řadou dalších proteinů. Zároveň dodejme, že poměrně slabé zvýšení intenzity pruhů potvrzuje očekávání o nízké míře exprese eukaryotických proteinů. Využití analogické metodiky pro přípravu prokaryotických proteinů vedlo

v předchozích studiích k indukci exprese v mnohonásobně větší míře (např. histidinkinasa [174], diguanylátcyklasa [175]).

Pro zvýšení míry exprese proteinů by bylo v dalším výzkumu eukaryotických proteinů například možné testovat provedení inkubace při nižší teplotě, které se v některých studiích ukázalo jako prospěšné díky zvýšení míry exprese chaperonů, a tedy zvýšení rozpustnosti cílových exprimovaných proteinů [176]. V literatuře se dále uvádí, že optimalizaci vyžaduje okamžik přidavku ITPG (tj. pro daný protein je třeba najít vhodnou hodnotu optické hustoty pro indukci exprese) [177] – Ou et al. např. ukázali [178], že vyšší míry exprese některých proteinů lze dosáhnout přidavkem IPTG již v dřívější fázi experimentu [178].

7.3 Izolace proteinu eIF2 α , resp. HRI

Výsledky jednotlivých kroků izolace proteinu eIF2 α a HRI byly analyzovány pomocí SDS-elektroforézy průběžně odebíraných vzorků. Analýzou supernatantu po ultracentrifugaci sonikované buněčné suspenze (jamka č. 2 na obou elektroforeogramech – eIF2 α na Obrázku 6, s. 55; HRI na Obrázku 9, s. 59) byla potvrzena přítomnost řady dalších proteinů v buněčném cytosolu po expresi proteinu eIF2 α , resp. HRI. Intenzita pruhů v této dráze byla v případě obou proteinů vyšší než v případě dráhy, v níž byl analyzován vzorek po přidavku IPTG, tj. indukci exprese daného proteinu (dráha č. 3 na obou elektroforeogramech – eIF2 α na Obrázku 5, s. 54; HRI na Obrázku 8, s. 58), což potvrzuje skutečnost, že desintegrace buněk sonikací a následná ultracentrifugace způsobila uvolnění cytosolárního obsahu. Část exprimovaných proteinů mohla být rovněž agregována v inkluzních těliscích, což by bylo možné ověřit elektroforetickou analýzou vzorku pelety po ultracentrifugaci. K této agregaci dochází vlivem špatného prostorového uspořádání exprimovaného proteinu, což je typický důsledek využití prokaryotického expresního systému k produkci eukaryotického proteinu [179].

Jako zásadní izolační krok se potvrdila následující purifikace proteinů pomocí afinitní chromatografie, založená na skutečnosti, že součástí plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α , resp. pET-21c(+)/HRI je též sekvence kódující C-koncovou histidinovou kotvu, prostřednictvím níž se protein váže na afinitní nosič nesoucí kobaltnatý kation. Protože např. molekula hemu vykazuje vysokou afinitu k histidinové kotvě, lze předpokládat, že v navazujících experimentech by mohla být přítomnost histidinové kotvy jako součásti izolovaných proteinů problematická. Řešením by mohlo být použití jiného typu kotvy (pro hemové senzorové proteiny byl uplatněn např. protein vážící maltosu [175], dále je používána např. polyargininová kotva, glutathion-*S*-transferasa aj. [180]), popř.

odstranění histidinové kotvy proteolýzou *a posteriori*. Tento přístup by však vyžadoval použití plasmidu nesoucího histidinovou kotvu se štěpicím místem pro proteasu (např. pET-28a nebo jiný vhodně upravený plasmid). Využití proteasy pro odstranění histidinové kotvy na konci izolačního postupu je riskantní z toho důvodu, že vlastním štěpicím krokem by mohlo dojít k proteolýze samotného proteinu nespecifickým působením použité proteasy.

Úspěšnost implementace afinitní chromatografie do izolačního procesu je patrná zvláště v případě proteinu eIF2 α , kde došlo k výraznému nárůstu intenzity pruhu v oblasti mobility standardu o molární hmotnosti 37 000 g mol⁻¹ (molární hmotnost eIF2 α je 36 000 g mol⁻¹) v jamce č. 3 (eluát v elučním pufru, viz Obrázek 6, s. 55), přičemž současně došlo k odstranění nečistot o vyšších molárních hmotnostech. Další purifikace se podařilo dosáhnout filtrací na membráně zadržující proteiny o molární hmotnosti převyšující 20 000 g mol⁻¹ (dráha č. 4).

V případě proteinu HRI byly tyto izolační kroky méně úspěšné (viz Obrázek 9, s. 59), neboť i v jamce č. 4 příslušející eluátu v elučním pufru byla pozorována řada dalších pruhů, stejně jako v preparátu získaném následující filtrací na membráně zadržující proteiny o molární hmotnosti převyšující 30 000 g mol⁻¹. Tyto pruhy mohou odpovídat např. některým cytosolárním proteinům bohatým na histidinové zbytky, které rovněž interagují s kobaltnatými kationty, a protože je míra exprese HRI nižší než míra exprese eIF2 α , mohou tyto balastní cytosolární proteiny bohaté na histidin interagovat s afinitním nosičem více v případě HRI než eIF2 α . Pruhy v oblasti nízkých molárních hmotností v elektroforeogramech získaných při izolaci eIF2 α i HRI mohou odpovídat produktům proteolytické degradace těchto proteinů, přestože v izolačních pufrech byly přítomny inhibitory proteas. V rámci dalšího výzkumu by proto bylo vhodné testovat použití jiné směsi inhibitorů proteas.

Mimoto dodejme, že protein o molární hmotnosti blízké 75 000 g mol⁻¹ byl rovněž přítomen v roztoku, který neinteragoval s afinitním nosičem (jamka č. 3 na Obrázku 9, s. 59). Lze se tedy domnívat, že protein HRI se nepodařilo na afinitní nosič kvantitativně navázat, protože kapacita tohoto nosiče byla inkubací se vzorkem vyčerpána, neboť vazebná místa mohla být ze značné části obsazena proteiny rovněž interagujícími s afinitním nosičem. Možným řešením by bylo použití většího množství afinitního nosiče.

Závěrečným krokem izolace proteinů byla gelová permeační chromatografie sledovaná pomocí spektrofotometrické detekce. V případě proteinu eIF2 α byly jako hlavní produkt jímány frakce č. 15–26 (eluční objem 7,0–13,0 ml). Protože však vysokou absorbanci vykazovaly i frakce v okolí elučního objemu 5,0 ml, byla též samostatně odebrána frakce

č. 10 (eluční objem 4,5–5,0 ml). Následná elektroforetická analýza potvrdila přítomnost proteinu o molární hmotnosti blízké $37\,000\text{ g mol}^{-1}$ jak ve frakcích č. 15–26, tak ve frakci č. 10. V dráze č. 5 (Obrázek 6, s. 55) příslušející frakci č. 10 byly nicméně pozorovány také pruhy v oblasti mobility standardů o vyšších molárních hmotnostech, oproti dráze č. 6 příslušející frakcím č. 15–26. Lze tedy usuzovat, že frakce č. 15–26 obsahovaly protein o molární hmotnosti blízké $37\,000\text{ g mol}^{-1}$ o vyšší čistotě. Protože v literatuře protein eIF2 α v roztocích charakterizován přesvědčivě jako monomer [181], je vysoce pravděpodobné, že frakce č. 15–26 obsahovaly monomerní eIF2 α , zatímco ve frakci č. 10 byl protein přítomen ve vyšších oligomerních stavech. K ověření závěrů o oligomerních stavech proteinu by byla nicméně nutná kalibrace chromatografické kolony za stejných podmínek separace.

V případě proteinu HRI byly jímány frakce č. 13–19 (eluční objem 6,0–9,5 ml, dráha č. 6 na Obrázku 9, s. 59). Vysoká absorbance byla zaznamenána také v okolí elučního objemu 11,0 ml a 14,0 ml. Pro omezení ztrát byly s ohledem na očekávání nízkého výtěžku ([166]) samostatně jímány též spojené frakce č. 20–25 (eluční objem 9,5–12,5 ml, dráha č. 7 na Obrázku 9, s. 59). Elektroforetickou analýzou se potvrdilo, že protein o molární hmotnosti blízké $75\,000\text{ g mol}^{-1}$ byl přítomen v obou vzorcích spojených frakcí spolu s nečistotami o vyšší molární hmotnosti, přičemž ve frakcích č. 20–25 byly také více zastoupeny nečistoty o nižší molární hmotnosti. Předchozí studie ukázaly, že protein HRI je vlivem autokinasové aktivity částečně purifikován ve fosforylované formě, přičemž pruh příslušející plně fosforylované formě HRI je přítomen v oblasti mobility standardu o molární hmotnosti $90\,000\text{ g mol}^{-1}$ [129]. Lze se tedy domnívat, že pruhy v oblasti mobility standardů o molárních hmotnostech vyšších než $75\,000\text{ g mol}^{-1}$ příslušejí HRI fosforylovanému do různého stupně (molární hmotnost HRI je $71\,000\text{ g mol}^{-1}$). Překvapivá je však skutečnost, že i součet intenzit tří pruhů v dráze č. 6 v oblasti $70\,000\text{--}100\,000\text{ g mol}^{-1}$ (potenciálně příslušných různě fosforylovaným formám HRI) je nižší než intenzita pruhu v oblasti odpovídající molární hmotnosti přibližně $58\,000\text{ g mol}^{-1}$, který je v izolovaném preparátu dominantní. K charakterizaci přítomných oligomerních stavů by byla opět nezbytná kalibrace chromatografické kolony, na základě výsledků předchozích studií se lze nicméně domnívat ([129]), že maximum absorbance příslušející frakcím č. 20–25 odpovídalo dimernímu a maximum ve frakcích č. 13–19 hexamernímu stavu proteinu HRI.

V konečných preparátech získaných filtrací spojených frakcí z gelové permeační chromatografie na membráně zachycující proteiny o molární hmotnosti převyšující danou mez (frakce č. 15–26 v případě proteinu eIF2 α , č. 13–19 v případě proteinu HRI) byla

spektrofotometricky stanovena koncentrace proteinů. Na základě přepočtu hmotnosti izolovaného proteinu na 1 l použitého kultivačního TB média bylo potvrzeno očekávání vyššího výtěžku pro protein eIF2 α (560 μ g na 1 l TB média) oproti výtěžku HRI (25 μ g na 1 l TB média). Vzhledem ke značnému znečištění izolovaného proteinu HRI oproti proteinu eIF2 α (odhadovaná čistota preparátu HRI 20 %, eIF2 α více než 90 %) je však skutečný výtěžek proteinu HRI zřejmě nižší. Pro zvýšení míry exprese proteinu HRI by bylo možné využít strategie přidavku vhodného prekursoru kofaktoru do kultivačního média, tj. vycházet z předpokladu, že v přítomnosti vhodného kofaktoru dosáhne protein správného prostorového uspořádání [179]. V případě HRI by bylo možné využít např. ALA, prekursoru syntézy hemu (viz oddíl 2.2.2, s. 24). Tento postup by nicméně vedl k přípravě holoformy proteinu namísto apoformy, tj. v získaném proteinu by byla obsazena vazebná místa pro hem, čímž by mohly být zkresleny výsledky experimentů zaměřených na interakci proteinu s hemem.

7.4 Spektrofotometrická charakterizace proteinu HRI

Autenticita konečného preparátu získaného při izolaci HRI byla studována pomocí spektrofotometrické charakterizace (viz oddíl 6.6, s. 61), přičemž k této charakterizaci byly využity především pásy v Soretově oblasti. Oproti roztoku samotného heminu (maximum při 394 nm) vykazuje apoforma proteinu HRI maximum při vyšší vlnové délce (410 nm), což podle literatury odpovídá přítomnosti vysokospinového hexakoordinovaného kationtu železitého [167]. Intenzita tohoto pásu je však velmi nízká, což odpovídá téměř zanedbatelnému obsahu hemu v preparátu izolovaného HRI. Přítomné molekuly hemu pocházejí pouze z endogenní syntézy, která bez přítomnosti prekursoru hemu probíhá velmi omezeně [182].

Teprve přidavek roztoku heminu vedl ke zvýšení intenzity Soretova pásu a k posunu vlnové délky maxima k 406 nm, která opět odpovídá přítomnosti hemu s hexakoordinovaným kationtem železitým. Následný přidavek dithioničitanu sodného způsobil redukci kationtu železitého na železnatý, přičemž tato změna se dle očekávání projevila dalším nárůstem vlnové délky absorpčního maxima (420 nm) za současného poklesu absorbance. Opětovný pokles vlnové délky absorpčního maxima byl zaznamenán po přidání oxidu uhelnatého (416 nm), přičemž v tomto případě byla absorbance nejvyšší ze všech případů. Popsané trendy v polohách a intenzitách absorpčních maxim v Soretově oblasti souhlasí s výsledky předchozích studií [167].

Na druhou stranu se od údajů uvedených v literatuře mírně odlišují nalezené absolutní hodnoty vlnových délek absorpčních maxim. Pro komplex proteinu HRI s kationtem železnatým je uváděno maximum při 426 nm (rozdíl 6 nm oproti stanovené hodnotě),

pro komplex s kationtem železnatým a oxidem uhelnatým při 420 nm (rozdíl 4 nm oproti stanovené hodnotě), pro komplex s kationtem železitým při 418 nm (rozdíl 12 nm oproti stanovené hodnotě) [167]. V prvních dvou případech lze rozdíl považovat za důsledek nedostatečné redukce iontu železitého na železnatý hemu, ve třetím případě byla hodnota vlnové délky absorpčního maxima pravděpodobně ovlivněna přítomností nečistot v analyzovaném preparátu.

Q pásy se vzhledem k jejich velmi nízké intenzitě podařilo identifikovat pouze v případě komplexu HRI s kationtem železnatým (525 nm, 555 nm) a komplexu HRI s kationtem železnatým a oxidem uhelnatým (535 nm, 564 nm). Tyto hodnoty jsou v uspokojivé shodě s výsledky uvedenými v literatuře (531 nm, 560 nm; resp. 539, 565 nm) [167]. V komplexu HRI s kationtem železitým nebyla identifikace maxim možná, v literatuře je pro absorpční maximum nicméně uvedena vlnová délka 538 nm [167].

Celkově lze tedy shrnout, že konečný preparát izolovaného proteinu HRI vykazoval schopnost specificky vázat hem do své senzorové domény, vzhledem ke shodě pozorovaných trendů v polohách a intenzitách absorpčních maxim v Soretově oblasti s údaji uvedenými v literatuře. Protože zároveň byla úspěšně potvrzena enzymová aktivita tohoto preparátu (viz následující oddíl), lze usuzovat, že se skutečně podařilo rekombinantní expresí preparát HRI připravit, nicméně jeho výtěžek ani čistota není uspokojivá.

7.5 Vliv donorů fosfátu na fosforylaci eIF2 α v přítomnosti a absenci proteinu HRI

Vliv donorů fosfátu na fosforylaci eIF2 α v přítomnosti kinasy HRI byl studován pomocí inkubačních směsí analyzovaných SDS-Phos-tag elektroforézou (viz oddíl 6.7 a Obrázek 12, s. 62), která umožňuje rozlišení fosforylovaných (nižší mobilita) a nefosforylovaných forem daných proteinů (vyšší mobilita). Protože proužky odpovídající fosforylovaným formám byly pozorovány pouze v drahách č. 3 (směs eIF2 α , HRI a ATP) a č. 4 (směs eIF2 α , HRI a GTP), lze usuzovat, že substrátem při fosforylaci proteinu eIF2 α katalyzované proteinem HRI může být mimo ATP také GTP, zatímco UTP a CTP nikoli. Pozitivní výsledek v případě ATP potvrzuje enzymovou aktivitu získaného preparátu HRI. Závěr získaný v případě GTP je překvapivý, neboť vazebná místa kinas bývají vůči ATP oproti GTP dostatečně selektivní, jak ukázala analýza 200 lidských kinas Bechera et al. [183]. Nejlépe prostudovanou výjimkou je kaseinkinasa 2, v jejímž případě GTP působí jako substrát účinností rovnocenně s ATP

[184]. V dalším výzkumu by bylo vhodné studovat kinetické parametry fosforylace eIF2 α využívající GTP jako substrát a srovnat získané výsledky s údaji známými pro ATP.

Protože v případě inkubační směsi proteinu eIF2 α (neobsahující HRI) s fosfoenolpyruvátem jako donorem fosforu nebyla detegována fosforylovaná forma proteinu eIF2 α (dráha č. 8 na Obrázku 12, s. 62), ukázalo se, že fosfoenolpyruvát není schopen působit jako zdroj fosforu pro fosforylaci proteinu eIF2 α . Nicméně v literatuře jsou popsány ještě další donory fosforu působící na různé proteiny, jako například acetylfosfát [185] a amidofosfát [186]. V dalším výzkumu proto bude vhodné studovat schopnost těchto donorů fosfátu fosforylovat protein eIF2 α .

8 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem hemového sensorového proteinu HRI a jeho substrátu, proteinu eIF2 α . Stanovené cíle této bakalářské práce byly naplněny. Konkrétně bylo dosaženo následujících výsledků:

- Dosavadní poznatky týkající se studované problematiky jsou shrnuty na stranách 11–36.
- Plasmid pET-21c(+)/eIF2 α byl úspěšně amplifikován a izolován. V celkovém objemu 50 μ l bylo získáno 5,3 mg plasmidové DNA v dostatečné čistotě. Autenticita tohoto plasmidu pro expresi proteinu eIF2 α v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) byla potvrzena dvěma nezávislými metodami.
- Protein eIF2 α byl úspěšně exprimován v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) po indukci exprese IPTG. Z 1 l TB média bylo získáno 5,6 g buněk *E. coli* BL-21(DE3).
- Protein HRI byl úspěšně exprimován v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) po indukci exprese IPTG. Z 1 l TB média bylo získáno 5,5 g buněk *E. coli* BL-21(DE3).
- Z celkového množství 90,1 g buněk *E. coli* BL-21(DE3) obsahujících protein eIF2 α byl tento protein úspěšně izolován. Celkový výtěžek proteinu byl 99 μ g z 1 g buněk, resp. 560 μ g z 1 l TB média. Koncentrace proteinu eIF2 α ve finálním preparátu byla 998 μ M a čistota byla odhadnuta na více než 90 %.
- Z celkového množství 88,6 g buněk *E. coli* BL-21(DE3) obsahujících protein HRI byl tento protein úspěšně izolován. Celkový výtěžek proteinu byl 4,6 μ g z 1 g buněk, resp. 25 μ g z 1 l TB média. Koncentrace proteinu HRI ve finálním preparátu byla 40 μ M a čistota byla odhadnuta na 20 %.
- Ačkoli protein HRI nebyl izolován v uspokojivém výtěžku a čistotě, vykazoval získaný preparát enzymovou aktivitu i schopnost interagovat specificky s hemem.
- Substrátem fosforylace eIF2 α katalyzované HRI může být mimo ATP také GTP. V případě UTP a CTP tato schopnost nebyla pozorována. Fosfoenolpyruvát není schopen fosforylovat protein eIF2 α .

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Malone, A.; Oyster, D. F.: The Shores of the Cosmic Ocean. In *Cosmos*, USA, 1980.
2. Alpher, R. A.; Bethe, H.; Gamow, G.: The Origin of Chemical Elements. *Physical Review*. **73**:7, 803–804 (1948).
3. Burbidge, E. M.; Burbidge, G. R.; Fowler, W. A.; Hoyle, F.: Synthesis of the Elements in Stars. *Reviews of Modern Physics*. **29**:4, 547–650 (1957).
4. Swanner, E. D.; Mloszewska, A. M.; Cirpka, O. A.; Schoenberg, R.; Konhauser, K. O.; Kappler, A.: Modulation of oxygen production in Archaean oceans by episodes of Fe(II) toxicity. *Nature Geoscience*. **8**:2, 126–130 (2015).
5. Simonson, B. M.: Origin and evolution of large Precambrian iron formations. *Geological Society of America Special Papers*. **370**, 231–244 (2003).
6. Fowler, N. J.; Blanford, C. F.; Warwicker, J.; De Visser, S. P.: Prediction of Reduction Potentials of Copper Proteins with Continuum Electrostatics and Density Functional Theory. *Chemistry*. **23**:61, 15436–15445 (2017).
7. Cooper, S. R.; McArdle, J. V.; Raymond, K. N.: Siderophore electrochemistry: relation to intracellular iron release mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **75**:8, 3551–3554 (1978).
8. Sánchez, M.; Sabio, L.; Gálvez, N.; Capdevila, M.; Domínguez-Vera, J.: Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life*. **69**:6, 382–388 (2017).
9. Fenton, H.: On a new reaction of tartaric acid. *Chem News*. **33**, 190 (1876).
10. Fenton, H.: The oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Proceedings of the Chemical Society*. **10**, 157–158 (1894).
11. Haber, F.; Weiss, J.: The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society*. **147**, 332–351 (1934).
12. Koppenol, W.; Hider, R. H.: Iron and redox cycling. Do's and don'ts. *Free Radical Biology and Medicine*. **133**, 3–10 (2019).
13. Barbusiński, K.: Fenton reaction – controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering*. **16**:3, 347–358 (2009).

14. Breuer, W.; Epsztejn, S.; Cabantchik, Z. I.: Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II). *Journal of Biological Chemistry*. **270**:41, 24209–24215 (1995).
15. Hider, R. C.; Kong, X. L.: Iron speciation in the cytosol: An overview. *Dalton Transactions*. **42**:9, 3220–3229 (2012).
16. Helm, L.; Merbach, A. E.: Inorganic and bioinorganic solvent exchange mechanism. *Chemical Reviews*. **105**:6, 1923–1959 (2005).
17. Williams, R. J. P.: Free manganese(II) and iron(II) cations can act as intracellular cell controls. *FEBS Letters*. **140**:1, 3–10 (1982).
18. Ying, W.: NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*. **10**:2, 179–206 (2008).
19. Hider, R. C.; Kong, X. L.: Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. *BioMetals*. **24**:6, 1179–1187 (2011).
20. Carrier, J.; Aghdassi, E.; Platt, I.; Cullen, J.; Allard, J. P.: Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. **15**:12, 1989–1999 (2001).
21. Knutson, M. D.: Non-transferrin-bound iron transporters. *Free Radical Biology and Medicine*. **133**, 101–111 (2019).
22. Grootveld, M.; Bell, J. D.; Halliwell, B.; Aruoma, O. I.; Bomford, A.; Sadler, P. J.: Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*. **264**:8, 4417–4422 (1989).
23. Hurrell, R.; Egli, I.: Iron bioavailability and dietary reference values. *American Journal of Clinical Nutrition*. **91**:5, 1461S–1467S (2010).
24. Miller, D. D.; Berner, L. A.: Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability? *Biological Trace Element Research*. **19**:1–2, 11–24 (1989).
25. McC., K. E. L.: Effect of Proton Pump Inhibitors on Vitamins and Iron. *American Journal of Gastroenterology*. **104**, S5–S9 (2009).

26. Frazer, D. M.; Anderson, G. J.: Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **289**:4, G631–G635 (2005).
27. Shayeghi, M.; Latunde-Dada, Y.; Oakhill, J.; Laftah, A.; Takeuchi, K.; Halliday, N.; Khan, Y.; Warley, A.; McCann, F.; Hider, R.; Frazer, D.; Anderson, G.; Vulpe, C.; Simpson, R.; McKie, A.: Identification of an Intestinal Heme Transporter. *Cell*. **122**:5, 789–801 (2005).
28. Atanasova, B. D.; Li, A. C.; Bjarnason, I.; Tzatchev, K. N.; Simpson, R. J.: Duodenal ascorbate and ferric reductase in human iron deficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*. **81**:1, 130–133 (2005).
29. Gunshin, H.; MacKenzie, B.; Berger, U.; Gunshin, Y.; Romero, M.; Boron, W.; Nussberger, S.; Gollan, J.; Hediger, M.: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. **388**:6641, 482–488 (1997).
30. Theil, E. C.; Chen, H.; Miranda, C.; Janser, H.; Elsenhans, B.; Núñez, M. T.; Pizzaro, F.; Schümann, K.: Absorption of Iron from Ferritin Is Independent of Heme Iron and Ferrous Salts in Women and Rat Intestinal Segments. *Journal of Nutrition*. **142**:3, 478–483 (2012).
31. Shi, H.; Bencze, K.; Stemmler, T. L.; Philpott, C.: A Cytosolic Iron Chaperone That Delivers Iron to Ferritin. *Science*. **320**:5880, 1207–1210 (2008).
32. Liu, X.; Theil, E. C.: Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry. *Accounts of Chemical Research*. **38**:3, 167–175 (2005).
33. Shaw, G. C.; Cope, J. J.; Li, L.; Corson, K.; Hersey, C.; Ackermann, G. E.; Gwynn, B.; Lambert, A. J.; Wingert, R. A.; Traver, D.; Trede, N. S.; Barut, B. A.; Zhou, Y.; Minet, E.; Donovan, A.; Brownlie, A.; Balzan, R.; Weiss, M. J.; Peters, L. L.; Kaplan, J.; Zon, L. I.; Paw, B. H.: Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*. **440**:7080, 96–100 (2006).
34. Batts, K. P.: Iron overload syndromes and the liver. *Modern Pathology*. **20**, S31–S39 (2007).
35. Donovan, A.; Brownlie, A.; Zhou, Y.; Shepard, J.; Pratt, S. J.; Moynihan, J.; Paw, B. H.; Drejer, A.; Barut, B.; Zapata, A.; Law, T. C.; Brugnara, C.; Lux, S. E.; Pinkus, G. S.; Pinkus, J. L.; Kingsley, P. D.; Palis, J.; Fleming, M. D.; Andrews, N. C.; Zon, L. I.: Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. **403**:6771, 776–781 (2000).

36. Vulpe, C. D.; Kuo, Y.-M.; Murphy, T. L.; Cowley, L.; Askwith, C.; Libina, N.; Gitschier, J.; Anderson, G. J.: Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature Genetics*. **21**:2, 195–199 (1999).
37. Healy, J.; Tipton, K.: Ceruloplasmin and what it might do. *Journal of Neural Transmission*. **114**:6, 777–781 (2007).
38. Kristiansen, M.; Graversen, J. H.; Jacobsen, C.; Sonne, O.; Hoffman, H.-J.; Law, S. K. A.; Moestrup, S. K.: Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. **409**:6817, 198–201 (2001).
39. Ohgami, R. S.; Campagna, D. R.; Greer, E. L.; Antiochos, B.; McDonald, A.; Chen, J.; Sharp, J. J.; Fujiwara, Y.; Barker, J. E.; Fleming, M. D.: Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nature Genetics*. **37**:11, 1264–1269 (2005).
40. Young, S.; Bomford, A.: Transferrin and cellular iron exchange. *Clinical Science*. **67**:3, 273–278 (1984).
41. Pollard, J. W.: Trophic macrophages in development and disease. *Nature Reviews Immunology*. **9**:4, 259–270 (2009).
42. Poss, K. D.; Tonegawa, S.: Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**:20, 10919–10924 (1997).
43. Andrews, N. C.: Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature Reviews Genetics*. **1**:3, 208–217 (2000).
44. Ganz, T.; Nemeth, E.: Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1763**:7, 690–699 (2006).
45. Zhang, A.-S.; Enns, C. A.: Iron Homeostasis: Recently Identified Proteins Provide Insight into Novel Control Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. **284**:2, 711–715 (2008).
46. Nemeth, E.; Tuttle, M. S.; Powelson, J.; Vaughn, M. B.; Donovan, A.; Ward, D. M.; Ganz, T.; Kaplan, J.: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. **306**:5704, 2090–2093 (2004).
47. Nemeth, E.; Ganz, T.: The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematologica*. **122**:2–3, 78–86 (2009).

48. Pak, M.; Lopez, M. A.; Gabayan, V.; Ganz, T.; Rivera, S.: Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. **108**:12, 3730–3735 (2006).
49. Peyssonnaud, C.; Zinkernagel, A. S.; Schuepbach, R. A.; Rankin, E.; Vaulont, S.; Haase, V. H.; Nizet, V.; Johnson, R. S.: Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *Journal of Clinical Investigation*. **117**:7, 1926–1932 (2007).
50. Zhang, A.-S.; Gao, J.; Koeberl, D. D.; Enns, C. A.: The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenetic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. **285**:22, 16416–16423 (2010).
51. Ramey, G.; Deschemin, J. C.; Vaulont, S.: Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes. *Haematologica*. **94**:6, 765–772 (2009).
52. Wrighting, D. M.; Andrews, N. C.: Interleukin–6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*. **108**:9, 3204–3209 (2006).
53. Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S.; Chang, G. W.; Clifford, S. C.; Vaux, E. C.; Cockman, M. E.; Wykoff, C. C.; Pugh, C. W.; Maher, E. R.; Ratcliffe, P. J.: The tumour suppressor protein targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. **399**:6733, 271–275 (1999).
54. Shah, Y. M.; Matsubara, T.; Ito, S.; Yim, S. H.; Gonzalez, F. J.: Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metabolism*. **9**:2, 152–164 (2009).
55. Anderson, C. P.; Shen, M.; Eisenstein, R. S.; Leibold, E. A.: Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1823**:9, 1468–1483 (2012).
56. Johnson, D. C.; Dean, D. R.; Smith, A. D.; Johnson, M. K.: Structure, function, and formation of biological iron–sulfur clusters. *Annual Reviews of Biochemistry*. **74**, 247–281 (2005).
57. Guo, B.; Phillips, J. D.; Yu, Y.; Leibold, E. A.: Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*. **270**:37, 21645–21651 (1995).

58. Zhang, D. L.; Hughes, R. M.; Ollivierre-Wilson, H.; Ghosh, M. C.; Rouault, T. A.: A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metabolism*. **9**:5, 461–473 (2009).
59. Kawabata, H.; Yang, R.; Hirama, T.; Vuong, P. T.; Kawano, S.; Gombart, A. F.; Koeffler, H. P.: Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *Journal of Biological Chemistry*. **274**:30, 20826–20832 (1999).
60. Hubert, N.; Hentze, M. W.: Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**:19, 12345–12350 (2002).
61. Guo, B.; Brown, F. M.; Phillips, J. D.; Yu, Y.; Leibold, E. A.: Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). Presence of multiple IRP2 transcripts regulated by intracellular iron levels. *Journal of Biological Chemistry*. **270**:28, 16529–16535 (1995).
62. Martins, R.; Proenca, D.; Silva, B.; Barbosa, C.; Silva, A. L.; Faustino, P.; Romao, L.: Alternative polyadenylation and nonsense-mediated decay coordinately regulate the human HFE mRNA levels. *PLOS One*. **7**:4, e35461 (2012).
63. Sánchez, M.; Bruguera, M.; Rodes, J.; Oliva, R.: Complete characterization of the 3' region of the human and mouse hereditary hemochromatosis HFE gene and detection of novel splicing forms. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. **27**:1, 35–43 (2001).
64. Tabuchi, M.; Tanaka, N.; Nishida-Kitayama, J.; Ohno, H.; Kishi, F.: Alternative splicing regulates the subcellular localization of divalent metal transporter 1 isoforms. *Molecular Biology of the Cell*. **13**:12, 4371–4387 (2002).
65. Patel, B. N.; Dunn, R. J.; David, S.: Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *Journal of Biological Chemistry*. **275**:6, 4305–4310 (2000).
66. Guillemot, J.; Canuel, M.; Essalmani, R.; Prat, A.; Seidah, N. G.: Implication of the proprotein convertases in iron homeostasis: proprotein convertase 7 sheds human transferrin receptor 1 and furin activates hepcidin. *Hepatology*. **57**:6, 2514–2524 (2013).

67. von Drygalski, A.; Adamson, J. W.: Iron Metabolism in Man. *Journal of Parental and Enteral Nutrition*. **37**:5, 599–606 (2013).
68. Crichton, R.: *Biological Inorganic Chemistry*. 3rd ed. London, Academic Press, 2019.
69. Lill, R.: Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature*. **460**:7257, 831–838 (2009).
70. Koorts, A. M.; Viljoen, M.: Ferritin and ferritin isoforms I: Structure–function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Archives of Physiology and Biochemistry*. **113**:1, 30–54 (2007).
71. Gomme, P. T.; McCann, K. B.; Bertolini, J.: Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today*. **10**:4, 267–273 (2005).
72. Johnson, E. E.; Wessling-Resnick, M.: Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes and Infection*. **14**:3, 207–216 (2012).
73. Elsayed, M. E.; Sharif, M. U.; Stack, A. G.: Transferrin Saturation: A Body Iron Biomarker. *Advances in Clinical Chemistry*. **75**, 71–97 (2016).
74. Chung, M. C. M.: Structure and function of transferrin. *Biochemical Education*. **12**:4, 146–154 (1984).
75. Fischer, H.; Orth, H.: *Die Chemie des Pyrrols*. Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft, 1937.
76. Moss, G. P.: Nomenclature of tetrapyrroles. *European Journal of Biochemistry*. **178**:2, 277–328 (1988).
77. Battersby, A. R.: Tetrapyrroles: the pigments of life. *Natural Product Reports*. **17**:6, 507–526 (2000).
78. Sarah E. J. Bowman; Bren, K. L.: The Chemistry and Biochemistry of Heme *c*: Functional Bases for Covalent Attachment. *Natural Product Reports*. **25**:6, 1118–1130 (2008).
79. Barupala, D. P.; Dzul, S. P.; Riggs-Gelasco, P. J.; Stemmler, T. L.: Synthesis, Delivery and Regulation of Eukaryotic Heme and Fe–S Cluster Cofactors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **592**, 60–75 (2016).
80. Kumar, S.; Bandyopadhyay, U.: Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*. **157**:3, 175–188 (2005).

81. Mueller-Eberhard, U.; Fraig, M.: Bioactivity of heme and its containments. *American Journal of Hematology*. **42**:1, 59–62 (1993).
82. Grinberg, L. N.; O'Brien, P. J.; Hrkal, Z.: The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalytic activities of hemin. *Free Radical Biology and Medicine*. **27**:1–2, 214–219 (1999).
83. Atamna, H.; Ginsburg, H.: Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*. **270**:42, 24876–24883 (1995).
84. Vercellotti, G. M.; Balla, G.; Balla, J.; Nath, K.; Eaton, J. W.; Jacob, H. S.: Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*. **22**:2, 207–213 (1994).
85. Chou, A. C.; Fitch, C. D.: Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. *Journal of Clinical Investigation*. **68**:3, 672–677 (1981).
86. Wagener, F. A.; Eggert, A.; Boerman, O. C.; Oyen, W. J.; Verhofstad, A.; Abraham, N. G.; Adema, G.; van Kooyk, Y.; de Witte, T.; Figdor, C. G.: Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. **98**:6, 1802–1811 (2001).
87. Giovannetti, R.: The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. In *Macro to Nano Spectroscopy*, Uddin, J., Ed. InTech: 2012.
88. Gouterman, M.: Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin. *Journal of Chemical Physics*. **30**:5, 1139–1161 (1959).
89. Bishop, D. F.; Henderson, A. S.; Astrin, K. H.: Human delta-aminolevulinate synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics*. **7**:2, 207–214 (1990).
90. Jaffe, E. K.; Abrams, W. R.; Kaempfen, H. X.; Harris Jr, K. A.: 5-Chlorolevulinate modification of porphobilinogen synthase identifies a potential role for the catalytic zinc. *Biochemistry*. **31**:7, 2113–2123 (1992).
91. Shoolingin-Jordan, P. M.; Al-Dbass, A.; McNeill, L. A.; Sarwar, M.; Butler, D.: Human porphobilinogen deaminase mutations in the investigation of the mechanism of dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole formation. *Biochemical Society Transactions*. **31**, 731–735 (2003).

92. Phillips, J. D.: Heme biosynthesis and the porphyrias. *Molecular Genetics and Metabolism*. **128**:3, 164–177 (2019).
93. Shoolingin-Jordan, P. M.: Porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III synthase: structure, molecular biology, and mechanism. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. **27**:2, 181–195 (1995).
94. Elder, G. H.; Roberts, A. G.: Uroporphyrinogen decarboxylase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. **27**:2, 207–214 (1995).
95. Bosman, G. J. C. G. M.; Willekens, F. L. A.; Werre, J. M.: Erythrocyte Aging: A More than Superficial Resemblance to Apoptosis? *Cellular Physiology and Biochemistry*. **16**:1–3, 1–8 (2005).
96. Porra, R. J.; Falk, J. E.: The enzymic conversion of coproporphyrinogen 3 into protoporphyrin 9. *Biochemical Journal*. **90**:1, 69–75 (1964).
97. Koch, M.; Breithaupt, C.; Kiefersauer, R.; Freigang, J.; Huber, R.; Messerschmidt, A.: Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *EMBO Journal*. **23**:8, 1720–1728 (2004).
98. Karlberg, T.; Hansson, M. D.; Yengo, R. K.; Johansson, R.; Thorvaldsen, H. O.; Ferreira, G. C.; Hansson, M.; Al-Karadaghi, S.: Porphyrin binding and distortion and substrate specificity in the ferrochelatase reaction: the role of active site residues. *Journal of Molecular Biology*. **378**:5, 1074–1083 (2008).
99. Tenhunen, R.; Marver, H. S.; Schmid, R.: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **61**:2, 748–755 (1968).
100. Maines, M. D.; Trakshel, G. M.; Kutty, R. K.: Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *Journal of Biological Chemistry*. **261**:1, 411–419 (1986).
101. Yoshida, T.; Kikuchi, G.: Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *Journal of Biological Chemistry*. **253**:12, 4224–4229 (1978).
102. Tsiftoglou, A. S.; Tsamadou, A. I.; Papadopoulou, L. C.: Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacology & Therapeutics*. **111**:2, 327–345 (2006).
103. Collman, J. P.; Boulatov, R.; Sunderland, C. J.; Fu, L.: Functional Analogues of Cytochrome *c* Oxidase, Myoglobin, and Hemoglobin. *Chemical Reviews*. **104**:2, 561–588 (2004).

104. Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C.: A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*. **181**:4610, 662–666 (1958).
105. Perutz, M. F.; Rossmann, M. G.; Cullis, A. F.; Muirhead, H.; Will, G.; North, A. C. T.: Structure of Haemoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å Resolutino, Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*. **185**:4711, 416–422 (1960).
106. Baldwin, J.; Clothia, C.: Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *Journal of Molecular Biology*. **129**:2, 175–220 (1979).
107. Wittenberg, J. B.; Wittengerg, A. B.; Peisach, J.; Blumberg, W. E.: On the State of the Iron and the Nature of the Ligand in Oxyhemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **67**:4, 1846–1853 (1970).
108. Bettati, S.; Mozzarelli, A.; Perutz, M. F.: Allosteric mechanism of haemoglobin: rupture of salt-bridges raises the oxygen affinity of the T-structure. *Journal of Molecular Biology*. **281**:4, 581–585 (1998).
109. Kilmartin, J. V.; Imai, K.; Jones, R. T.; Faruqui, A. R.; Fogg, J.; Baldwin, J. M.: Role of Bohr group salt bridges in cooperativity in hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **534**:1, 15–25 (1978).
110. Moody, P. C. E.; Raven, E. L.: The Nature and Reactivity of Ferryl Heme in Compounds I and II. *Accounts of Chemical Research*. **51**:2, 427–435 (2018).
111. Nelson, D. R.; Kamataki, T.; Waxman, D. J.; Guengerich, F. P.; Estabrook, R. W.; Feyereisen, R.; Gonzalez, F. J.; Coon, M. J.; Gunsalus, I. C.; Gotoh, O.: The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA and Cell Biology*. **12**:1, 1–51 (1993).
112. Guengerich, F. P.; Wu, Z. L.; Bartleson, C. J.: Function of human cytochrome P450s: characterization of the orphans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **338**:1, 465–469 (2005).
113. Meyer, R. P.; Podvinec, M.; Meyer, U. A.: Cytochrome P450 CYP1A1 accumulates in the cytosol of kidney and brain and is activated by heme. *Molecular Pharmacology*. **62**:5, 1061–1067 (2002).
114. Johnston, J. B.; Ouellet, H.; Podust, L. M.; Ortiz de Montellano, P. R.: Structural control of cytochrome P450-catalyzed omega-hydroxylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **507**:1, 86–94 (2011).

115. Qin, L.; Hiser, C.; Mulichak, A.; Garavito, R. M.; Ferguson-Miller, S.: Identification of conserved lipid/detergent-binding sites in a high-resolution structure of the membrane protein cytochrome *c* oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**:44, 16117–16122 (2006).
116. Keilin, D.: On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast and higher plants. *Proceedings of the Royal Society*. **98**, 312–339 (1925).
117. Zhang, Z.; Huang, L.; Shulmeister, V. M.; Chi, Y. I.; Kim, K. K.; Hung, L. W.; Crofts, A. R.; Berry, E. A.; Kim, S. H.: Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc₁*. *Nature*. **392**:6677, 677–684 (1998).
118. Farhana, A.; Saini, V.; Kumar, A.; Lancaster, J. R.; Steyn, A. J. C.: Environmental Heme-Based Sensor Proteins: Implications for Understanding Bacterial Pathogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*. **17**:9, 1232–1245 (2012).
119. Shimizu, T.; Lengalova, A.; Martinek, V.; Martinkova, M.: Heme: emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chemical Society Reviews*. **48**:24, 5624–5657 (2019).
120. Girvan, H. M.; Munro, A. W.: Heme Sensor Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. **288**:19, 13194–13203 (2013).
121. Shimizu, T.: Binding of cysteine thiolate to the Fe(III) heme complex is critical for the function of heme sensor proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **108**, 171–177 (2012).
122. Baird, T. D.; Wek, R. C.: Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation and Translational Control in Metabolism. *American Society for Nutrition, Advances in Nutrition*. **3**:3, 307–321 (2012).
123. Chefalo, P. J.; Oh, K.; Rafie-Kolpin, M.; Kan, B.; Chen, J. J.: Heme-regulated eIF2 α kinase purifies as a hemoprotein. *European Journal of Biochemistry*. **258**:2, 820–830 (1998).
124. Crosby, J. S.; Lee, K.; London, I. M.; Chen, J. J.: Erythroid expression of the heme-regulated eIF2 α -kinase. *Molecular and Cellular Biology*. **14**:6, 3906–3914 (1994).
125. Mellor, H.; Flowers, K. M.; Kimball, S. R.; Jefferson, L. S.: Cloning and characterization of cDNA encoding rat hemin-sensitive initiation factor-2 α (eIF-2 α) kinase. Evidence for multitissue expression. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:14, 10201–10204 (1994).

126. Berlanga, J. J.; Herrero, S.; Haro, C.: Characterization of the heme-sensitive eukaryotic initiation factor 2 α kinase from mouse nonerythroid cells. *Journal of Biological Chemistry*. **273**:48, 32340–32346 (1998).
127. Bauer, B. N.; Rafie-Kolpin, M.; Lu, L.; Han, A.; Chen, J.-J.: Multiple autophosphorylation is essential for the formation of the active and stable homodimer of heme-regulated eIF-2 α kinase. *Biochemistry*. **40**:38, 11543–11551 (2001).
128. Rafie-Kolpin, M.; Chefalo, P. J.; Hussain, Z.; Hahn, J.; Uma, S.; Matts, R. L.; Chen, J.-J.: Two heme-binding domains of heme-regulated eIF2- α kinase: N-terminus and kinase insertion. *Journal of Biological Chemistry*. **275**:7, 5171–5178 (2000).
129. Miksanova, M.; Igarashi, J.; Minami, M.; Sagami, I.; Yamauchi, S.; Kurokawa, H.; Shimizu, T.: Characterization of Heme-Regulated eIF2 α Kinase: Roles of the N-Terminal Domain in the Oligomeric State, Heme Binding, Catalysis, and Inhibition. *Biochemistry*. **45**:32, 9894–9905 (2006).
130. Igarashi, J.; Murase, M.; Iizuka, A.; Pichierri, F.; Martinkova, M.; Shimizu, T.: Elucidation of the Heme Binding Site of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase and the Role of the Regulatory Motif in Heme Sensing by Spectroscopic and Catalytic Studies of Mutant Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. **283**:27, 18782–18791 (2008).
131. Chen, J.-J.: Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias. *Blood*. **109**:7, 2693–2699 (2007).
132. Rafie-Kolpin, M.; Han, A. P.; Chen, J.-J.: Autophosphorylation of threonine 485 in the activation loop is essential for attaining eIF2 α kinase activity of HRI. *Biochemistry*. **42**:21, 6536–6544 (2003).
133. Bhavnani, V.; Swarnendu, K.; Savergave, L.; Raghuwanshi, A. S.; Kumar, A.; Kumar, A.; Pal, J.: HRI, a stress response eIF2 α kinase, exhibits structural and functional stability at high temperature and alkaline conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*. **95**, 528–538 (2017).
134. Waks, M.; Yip, Y. K.; Beychok, S.: Influence of prosthetic groups on protein folding and subunit assembly: recombination of separated human α - and β -globin chains with heme and alloplex interactions of globin chains with heme-containing subunits. *Journal of Biological Chemistry*. **248**:18, 6462–6470 (1973).

135. Lu, L.; Han, A. P.; Chen, J.-J.: Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Molecular and Cellular Biology*. **21**:23, 7971–7980 (2001).
136. Acharya, P.; Chen, J.-J.; Correia, M. A.: Hepatic heme-regulated inhibitor (HRI) eukaryotic initiation factor 2alpha kinase: a protagonist of heme-mediated translational control of CYP2B enzymes and a modulator of basal endoplasmic reticulum stress tone. *Molecular Pharmacology*. **77**:4, 575–592 (2010).
137. Jiang, S.; Yan, C.; Fang, Q.; Shao, M.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Deng, Y.; Shan, B.; Liu, J.; Li, H.; Yang, L.; Zhou, J.; Dai, Z.; Liu, Y.; Jia, W.: Fibroblast growth factor 21 is regulated by the IRE1alpha-XBP1 branch of the unfolded protein response and counteracts endoplasmic reticulum stress-induced hepatic steatosis. *Journal of Biological Chemistry*. **289**:43, 29751–29765 (2014).
138. Liu, S.; Suragani, R. N. V. S.; Wang, F.; Han, A.; Zhao, W.; Andrews, N. C.; Chen, J.-J.: The function of heme-regulated eIF2 α kinase in murine iron homeostasis and macrophage maturation. *Journal of Clinical Investigation*. **117**:11, 3296–3305 (2007).
139. Storey, G. P.; Opitz-Araya, X.; Barria, A.: Molecular determinants controlling NMDA receptor synaptic incorporation. *Journal of Neuroscience*. **31**:17, 6311–6316 (2011).
140. He, Y.; Correa, A. M.; Raso, M. G.; Hofstetter, W. L.; Fang, B.; Behrens, C.; Roth, J. A.; Zhou, Y.; Yu, L.; Wistuba, I. I.; Swisher, S. G.; Pataer, A.: The role of PKR/eIF2 α signalling pathway in prognosis of non-small cell lung cancer. *PLOS One*. **6**:11, e24855 (2011).
141. Mounir, Z.; Krishnamoorthy, J. L.; Robertson, G. P.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J.; Georgescu, M.-M.; Koromilas, A. E.: Tumor suppression by PTEN requires the activation of the PKR-eIF2 α phosphorylation pathway. *Science Signaling*. **2**:102, ra85 (2009).
142. Chen, T.; Ozel, D.; Qiao, Y.; Harbinski, F.; Chen, L.; Denoyelle, S.; He, X.; Zvereva, N.; Supko, J. G.; Chorev, M.; Halperin, J. A.; Aktas, B. H.: Chemical genetics identify eIF2 α kinase heme-regulated inhibitor as an anticancer target. *Nature Chemical Biology*. **7**:9, 610–616 (2011).
143. Chen, L.; Aktas, B. H.; Wang, Y.; He, X.; Sahoo, R.; Zhang, N.; Denoyelle, S.; Kabha, E.; Yang, H.; Freedman, R. Y.; Supko, J. G.; Chorev, M.; Wagner, G.; Halperin, J. S.: Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation. *Oncotarget*. **3**:8, 869–881 (2012).

144. Aktas, B. H.; Qiao, Y.; Ozdelen, E.; Schubert, R.; Sevinc, S.; Harbinski, F.; Grubisich, L.; Singer, S.; Halperin, J. A.: Small-Molecule targeting of translation initiation for cancer therapy. *Oncotarget*. **4**:10, 1606–1617 (2013).
145. Kimball, S. R.: Eukaryotic initiation factor eIF2. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **31**:1, 25–29 (1999).
146. Jackson, R. J.; Hellen, C. U.; Pestova, T. V.: The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **11**:2, 113–127 (2010).
147. Sonnenberg, N.; Hinnebusch, A. G.: Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanism and biological targets. *Cell*. **136**:4, 731–745 (2009).
148. Webb, B. L.; Proud, C. G.: Eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **29**:10, 1127–1131 (1997).
149. Preiss, T.; Hentze, M. W.: Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays*. **25**:12, 1201–1211 (2003).
150. Harding, H. P.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Novoa, I.; Lu, P. D.; Calton, M.; Sadri, N.; Yun, C.; Popko, B.; Paules, R.; Stojdl, D. F.; Bell, J. C.; Hettmann, T.; Leiden, J. M.; Ron, D.: An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*. **11**:3, 619–633 (2003).
151. Donnelly, N.; Gorman, A. M.; Gupta, S.; Samali, A.: The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **70**:19, 3493–3511 (2013).
152. Pakos-Zebrucka, K.; Koryga, I.; Mnich, K.; Ljujic, M.; Samali, A.; Gorman, A. M.: The integrated stress response. *EMBO reports*. **17**:10, 1374–1395 (2016).
153. Meurs, E.; Chong, K.; Galabru, J.; Thomas, N. S.; Kerr, I. M.; Williams, B. R.; Hovanessian, A. G.: Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*. **62**:2, 379–390 (1990).
154. Li, S.; Peters, G. A.; Ding, K.; Zhang, X.; Qin, J.; Sen, G. C.: Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**:26, 10005–10010 (2006).
155. Harding, H. P.; Zhang, Y.; Ron, D.: Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. **397**:6716, 271–274 (1999).

156. Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Hendershot, L. M.; Harding, H. P.; Ron, D.: Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*. **2**:6, 326–332 (2000).
157. Sanderson, T. H.; Deogracias, M. P.; Nangia, K. K.; Wang, J.; Krause, G. S.; Kumar, R.: PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) activation following brain ischemia is independent of unfolded nascent proteins. *Neuroscience*. **169**:3, 1307–1314 (2010).
158. Kilberg, M. S.; Pan, Y. X.; Chen, H.; Leung-Pineda, V.: Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annual Review of Nutrition*. **25**, 59–85 (2005).
159. Narasimhan, J.; Statschke, K. A.; Wek, R. C.: Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. *Journal of Biological Chemistry*. **279**:22, 22820–22832 (2004).
160. Novagen: pET-21a-d(+) Vectors, user manual TB036. http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-21a-d_MAP.pdf.
161. Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A.: Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *Proteomics Protocols Handbook*, Walker, J. M., Ed. Humana Press: 2005; pp 571–607.
162. Consortium, T. U.: UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*. **49**:D1, D480–D489 (2020).
163. Boye, E. G., B.: eIF2 α phosphorylation and the regulation of translation. *Current Genetics*. **66**, 293–297 (2020).
164. Vávra, J. *Porovnání vlastností transkripčního faktoru "Bach1" v jeho apoformě a holoformě*. Praha, 2019. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Martínková, M.
165. Sergunin, A. *Nový potenciální zástupce eukaryotických hemových senzorových proteinů, protein p53*. Praha, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Martínková, M.
166. Fojtík, L. *Charakterizace vybraných vlastností modelových zástupců hemových senzorových proteinů*. Praha, 2018. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Martínková, M.
167. Igarashi, J.; Sato, A.; Kitagawa, T.; Yoshimura, T.; Yamauchi, S.; Sagami, I.; Shimizu, T.: Activation of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase by

Nitric Oxide Is Induced by the Formation of a Five-coordinate NO-Heme Complex. *Journal of Biological Chemistry*. **279**:16, 15752–15762 (2004).

168. Lengálová, A. *Studium struktury a funkce modelových hemových proteinů*. Praha, 2020. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Martínková, M.

169. Taylor, R. G.; Walker, D. C.; McInnes, R. R.: *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research*. **21**:7, 1677–1678 (1993).

170. Jeong, H.; Kim, H. J.; Lee, S. J.: Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain BL21. *Genome Announcements*. **3**:2, e00134–e00135 (2015).

171. Hausjell, J.; Weissensteiner, J.; Molitor, C.; Halbwirth, H.; Spadiut, O.: *E. coli* HMS174(DE3) is a sustainable alternative to BL21(DE3). *Microbial Cell Factories*. **17**:1, 169 (2018).

172. Hanahan, D.; Jessee, J.; Bloom, F. R.: Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*. **204**, 63–113 (1991).

173. Studier, F. W.; Moffatt, B. A.: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*. **189**:1, 113–130 (1986).

174. Skalova, T.; Lengalova, A.; Dohnalek, J.; Harlos, K.; Mihalcin, P.; Kolenko, P.; Stranova, M.; Blaha, J.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: Disruption of the dimerization interface of the sensing domain in the dimeric heme-based oxygen sensor *Af* GcHK abolishes bacterial signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*. **295**:6, 1587–1597 (2020).

175. Lengalova, A.; Fojtikova-Proskova, V.; Vavra, J.; Martinek, V.; Stranova, M.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: Kinetic analysis of a globin-coupled diguanylate cyclase, YddV: Effects of heme iron redox state, axial ligands, and heme distal mutations on catalysis. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **201**, 110833 (2019).

176. Sahdev, S.; Khattar, S. K.; Saini, K. S.: Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **307**, 249–264 (2008).

177. Briand, L.; Marcion, G.; Kriznik, A.; Heydel, J. M.; Artur, Y.; Garrido, C.; Seigneiric, R.; Neiers, F.: A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports, Nature Publishing Group*. **6**, 33037 (2016).

178. Ou, J.; Wang, L.; Ding, X.; Du, J.; Zhang, Y.; Chen, H.: Stationary phase protein overproduction is a fundamental capability of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **314**, 174–180 (2004).
179. Carrio, M. M.; Villaverde, A.: Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of Biotechnology*. **96**, 3–12 (2002).
180. Terpe, K.: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **60**, 523–533 (2003).
181. Adomavicius, T.; Guaita, M.; Zhou, Y.; Jennings, M. D.; Latif, Z.; Roseman, A. M.; Pavitt, G. D.: The Structural Basis of Translational Control by eIF2 Phosphorylation. *Nature Communications*. **10**, 2136–2136 (2019).
182. Jung, Y.; Kwak, J.; Lee, Y.: High-level production of heme-containing holoproteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **55**, 187–191 (2001).
183. Becher, I.; Savitski, M. M.; Savitski, M. F.; Hopf, C.; Bantscheff, M.; Drewes, G.: Affinity Profiling of the Cellular Kinome for the Nucleotide Cofactors ATP, ADP, and GTP. *ACS Chemical Biology*. **8**:3, 599–607 (2013).
184. Niefind, K.; Pütter, M.; Guerra, B.; Issinger, O.-G.; Schomburg, D.: GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nature Structural Biology*. **6**, 1100–1103 (1999).
185. McCleary, W. R.: The activation of PhoB by acetylphosphate. *Molecular Microbiology*. **20**:6, 1155–1163 (1996).
186. Castro, N. S. S.; Laia, C. A. T.; Maiti, B. K.; Cerqueira, N. M. F. S. A.; Moura, I.; Carepo, M. S. P.: Small phospho-donors phosphorylate MorR without inducing protein conformational changes. *Biophysical Chemistry*. **240**, 25–33 (2018).